

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DES CAUSES D'ERREURS DANS LES RÉACTIONS D'HÉMAGGLUTINATION ROLE DU CUIVRE

par V. SAUTTER et P. LÉPINE (*).

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

Nous avons, dans un travail antérieur (1) étudié et décrit la technique de la réaction d'agglutination de Hirst et Mc Clelland pour le diagnostic de la grippe, réaction permettant le diagnostic de cette infection par une méthode sérologique, dont la valeur est indiscutable et la pratique aujourd'hui universellement adoptée. En insistant sur un certain nombre de précautions à observer pour conserver à la méthode toute sa rigueur (emploi d'une verrerie scrupuleusement propre servant à cet usage exclusif, etc...), nous avons au passage indiqué que l'une des précautions à observer, consistait dans l'emploi d'eau bidistillée privée de sels de cuivre. Nous avons en effet observé au cours d'essais répétés, que l'inobservation de certaines de ces précautions pouvait entraîner des réactions aberrantes ou non spécifiques.

La recherche des causes d'erreurs nous a conduits ainsi à une étude systématique des agglutinations aberrantes et de certains facteurs capables de les provoquer ou de les influencer.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 janvier 1948.

(1) P. LÉPINE, V. SAUTTER et L. REINIÉ, ces *Annales*, 1946, 72, 523.

TECHNIQUE.

Nous avons employé, dans les mêmes conditions que pour la réaction de Hirst, des suspensions d'hématies de poule, au taux originel de 0,6 p. 100 (ramené à 0,3 p. 100 du fait des dilutions dans le tube à réaction). Nous avons vérifié par ailleurs, que l'emploi d'hématies humaines ou d'hématies de poulet ne modifie pas les résultats obtenus. La recherche de l'agglutination des hématies a été faite en opérant toujours sur une rangée de 10 tubes à hémolyse renfermant chacun, pour un volume total de 1 cm³, 0,5 cm³ de suspension d'hématies et la même quantité de facteur actif ou supposé tel pour toute la rangée. On disposait ainsi autant de rangées de 10 tubes qu'il y avait de facteurs à examiner, les concentrations variant d'une rangée à l'autre. La lecture était faite après repos d'une heure trente à la température du laboratoire. D'une manière générale il faut remarquer que les résultats obtenus dans les réactions aberrantes sont des plus irréguliers lorsqu'on se trouve à la limite d'action des facteurs susceptibles d'intervenir ; et que, fréquemment, une réaction répétée par le même opérateur, ou réalisée simultanément par deux opérateurs avec les mêmes solutions, donne des résultats différents.

Nous n'avons en général employé, ni virus grippal, ni sérum anti. Dans ces conditions, les réactions auraient dû être constamment négatives (2).

Notons encore que seules des hématies préparées le matin même ont été employées, leur conservation, même à la glacière, diminuant leur sensibilité aux facteurs provoquant les réactions aberrantes.

Il va sans dire que tous les témoins nécessaires ont été effectués pour chaque réaction et notamment que nous avons vérifié par l'emploi de virus grippal et de sérum anti, que les différentes conditions dans lesquelles nous nous plaçons et où il n'était pas observé d'agglutination positive, ne s'opposaient pas à une agglutination normale en présence de virus grippal, et qu'inversement, dans les cas où l'agglutination des hématies avait lieu en l'absence d'antigène ou d'antigène et de sérum, l'addition de ces éléments ne modifiait pas les résultats aberrants obtenus.

(2) Dans les exemples donnés ci-après, le signe + indique l'apparition d'une agglutination positive (sous forme d'un dépôt homogène rose saumon occupant toute la demi-sphère du fond du tube à agglutination) et par conséquent de résultats aberrants susceptibles, le cas échéant, de fausser les réactions véritables. Le signe 0 indique l'absence d'agglutination (sédimentation normale des hématies au fond du tube). Le signe \pm indique une réaction douteuse, traduisant, en fait, un début d'agglutination.

INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DE L'EAU. — Nous avons remarqué que la durée de conservation, avant son emploi, de l'eau distillée physiologique servant aux dilutions influe grandement sur les résultats de la réaction. Notons ici une fois pour toutes que l'eau employée est rendue isotonique par addition de 9,5 g. p. 1.000 de NaCl ; par conséquent les termes d'eau distillée ou d'eau bidistillée employés ci-après désignent toujours de l'eau physiologique préparée avec l'eau distillée ou bidistillée, etc. Si l'eau distillée fraîchement préparée donne des résultats négatifs (absence d'agglutination spontanée), par contre, l'eau distillée vieillie provoque des agglutinations aberrantes.

Exemple :

Eau distillée fraîche	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Eau distillée vieille de trois mois et demi	+++++

Par contre, les mêmes opérations répétées avec une eau bidistillée préparée de fraîche date ou ancienne donnent une absence constante d'agglutination ; par conséquent, *le vieillissement de l'eau distillée la rend agglutinante. Le phénomène ne se produit pas si, pour préparer les solutions physiologiques, on a employé de l'eau bidistillée.*

Le temps nécessaire pour faire apparaître l'agglutination positive au moyen d'une eau physiologique stérile abandonnée au vieillissement, est d'environ deux semaines ; en effet, l'eau physiologique âgée de vingt jours donne des résultats positifs ou douteux, irrégulièrement répartis sur la rangée de tubes observés.

INFLUENCE DU pH. — En présence de ces résultats, la première hypothèse fut celle de la fixation, par l'eau physiologique stérile, du CO_2 atmosphérique ou de produits volatils susceptibles d'en modifier le pH.

Des mesures électrométriques nous ont montré qu'il n'y avait pas de différence de pH sensible entre l'eau distillée fraîchement préparée et l'eau distillée vieillie ; de plus, en opérant à l'aide de solutions tampons, il nous a été possible de vérifier que dans une marge assez large, allant de 6,3 à 8,5 (limite des pH de nos essais), le pH des solutions était sans action sur la réaction de la grippe classiquement opérée.

Ajoutons tout de suite, pour n'avoir pas à revenir sur ce sujet, que l'addition de sels de cuivre, dont il est question ci-dessous, s'est montrée, au taux employé, sans action également sur le pH des solutions entrant en jeu dans la réaction.

ACTION DE LA STÉRILISATION. — Nous avons observé que si l'on opère avec une eau distillée stérile dont le vieillissement a provoqué

depuis peu l'agglutination des globules rouges, il suffit de la stériliser à l'autoclave pour lui rendre les qualités d'une eau fraîchement préparée et supprimer l'action exercée sur les hématies. Par contre, il peut arriver, mais non constamment, que l'action de la stérilisation soit plus faible ou nulle si l'eau est vieillie depuis longtemps.

Exemple :

Eau distillée de vingt jours	+++++±±±± 0
La même après restérilisation	0 0 0 0 0 0 0 0
Eau distillée de trois mois et demi.	+++++ + + + + ±
La même eau après restérilisation	+++++ ± ± ± ± ± 0

Par conséquent, la restérilisation d'une eau distillée stérile de vingt jours, qui agglutine un certain nombre de tubes dans la réaction, permet d'obtenir à nouveau des réactions normales, mais la même opération répétée sur une eau vieillie de trois mois et demi est d'un effet moins constant.

Cependant, nous avons observé que l'eau distillée, vieillie d'un mois, stérilisée en ampoules scellées, et non pas en ampoules bouchées au coton comme il est d'usage, reste agglutinante. Ceci suggère l'intervention des gaz en solution dans l'eau.

ACTION DU DÉGAZAGE. — Nous avons recherché si l'élimination sous vide des gaz en solution dans l'eau permettait de restituer à une eau vieillie son absence d'action sur la suspension d'hématies. Nous avons pour cela placé sous la cloche à vide dont l'atmosphère est évacuée par une pompe à palettes fournissant un vide poussé, de l'eau physiologique stérile vieille de vingt jours et une même eau datant de trois mois et demi ; les résultats ont été les suivants :

Eau de vingt jours non traitée	+++++ + + + + ±
Eau de vingt jours dégazée	+++++ + + + + ± 0 0
Eau vieille de trois mois non traitée	+++++ + + + + ±
Eau de trois mois dégazée	+++++ ± ± ± ± ± 0 0

On voit que le dégazage de l'eau vieillie ne modifie que dans une faible mesure son pouvoir agglutinant.

ACTION DU BARBOTAGE PAR L'AIR COMPRIMÉ. — Le dégazage s'étant montré presque sans action, nous avons essayé si, au contraire, le barbotage d'air comprimé aurait une influence sur les résultats obtenus.

Pour cela, de l'eau distillée physiologique vieillie de trois mois et demi, donc provoquant à coup sûr l'agglutination des hématies, a été disposée dans un récipient dans lequel un tube plongeant amenait de l'air comprimé filtré de manière à produire un abon-

dant barbotage gazeux qui a été prolongé pendant trois heures. Voici un des résultats obtenus :

Eau vieille de trois mois et demi.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
La même eau après barbotage d'air comprimé .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

On voit que *le barbotage par l'air rend à l'eau distillée vieillie ses propriétés originelles et supprime le pouvoir agglutinant acquis par le vieillissement.*

ACTION DES SELS DE CUIVRE. — Nous avons, dès le début de nos expériences, suspecté parmi les causes de réactions aberrantes l'action des sels de cuivre dont nous n'ignorons pas la présence dans l'eau distillée fournie à notre laboratoire.

Nous employons en effet, pour les besoins courants, une eau distillée fabriquée semi-industriellement au moyen d'un appareil en cuivre ; l'eau ainsi obtenue renferme constamment des quantités appréciables de cuivre, pouvant aller jusqu'à 2 mg. par litre, et habituellement de l'ordre du milligramme.

Pour les recherches nécessitant une eau rigoureusement pure, celle-ci subit une distillation nouvelle dans une bouteille en verre pyrex ; elle est qualifiée d'eau bidistillée et ne renferme pas de cuivre. Nous avons vu plus haut le comportement différent au cours du vieillissement de l'eau distillée et de l'eau bidistillée ; la différence principale entre les deux préparations réside dans la présence d'impuretés, dont la plus manifeste est le cuivre.

Nous avons recherché systématiquement, par l'addition de sels de cuivre à de l'eau bidistillée, quels seraient les résultats sur l'agglutination des hématies.

a) *Action du sulfate de cuivre.* — Jusqu'à 1 mg. de sulfate de cuivre (sel cristallisé) par litre, on n'observe pratiquement pas de réactions aberrantes dues à l'influence de ce seul sel ; à partir de 1 mg. ou 1,2 mg., on voit apparaître des réactions aberrantes et, en règle générale, l'agglutination est constante à partir de 1,4 mg. ; mais, pour des raisons que nous n'avons pas éclaircies, il existe des exceptions et, dans quelques expériences, il a fallu aller jusqu'à 2,5 mg. pour observer la constance de l'effet agglutinant du sulfate de cuivre, mais avec des quantités supérieures à 2 mg., les hématies s'agglutinent en gros agglomérats qui ne peuvent être à l'origine d'erreurs, leur aspect étant très différent de celui dû à la réaction de Hirst classique.

b) *Action de l'acétate neutre de cuivre.* — De 0,1 à 0,4 mg. d'acétate neutre de cuivre par litre (sel cristallisé), on n'observe aucune action sur les hématies ; à partir de 0,6 mg. d'acétate par litre, les hématies sont habituellement agglutinées, mais, de même que pour le sulfate de cuivre, la répétition de l'opération nous a

montré que dans quelques cas, ce taux lui-même doit être augmenté jusqu'à au moins 1,4 mg. par litre.

c) *Action du carbonate de cuivre.* — 5 mg. de carbonate de cuivre cristallisé se sont montrés sans effet sur l'agglutination des globules rouges ; 10 mg. ont été positifs environ une fois sur deux et 15 mg. constamment positifs. Les quantités de ce sel nécessaires pour fausser la réaction étant trop élevées pour être vraisemblablement rencontrées dans l'eau distillée, la suite des expériences a été effectuée uniquement avec de l'acétate et du sulfate de cuivre.

ACTION DE LA STÉRILISATION SUR LES SELS DE CUIVRE. — Des solutions de sulfate de cuivre ont été préparées à des concentrations croissantes de 0,6 mg./l. à 2,2 mg./l. ; une moitié de la solution est conservée quelques heures à titre de contrôle, l'autre stérilisée immédiatement à l'autoclave. Additionnées d'hématies, les solutions ayant passé à l'autoclave n'ont, en aucun cas, provoqué d'agglutination, alors que les témoins gardés à la température du laboratoire à la concentration de 1,2 mg./l. ont provoqué quelques agglutinations aberrantes et se sont montrés constamment agglutinants à partir de 1,8 mg. *L'eau bidistillée additionnée de sulfate de cuivre se comporte donc comme l'eau distillée et voit son pouvoir agglutinant disparaître par stérilisation à l'autoclave.*

INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DE L'EAU BIDISTILLÉE ADDITIONNÉE DE SULFATE DE CUIVRE. — Ces mêmes solutions stérilisées conservées à la température du laboratoire redevenaient agglutinantes dès le septième jour. Une nouvelle stérilisation entraîne une disparition de cette propriété ; *l'eau bidistillée additionnée de sulfate de cuivre se comporte donc dans ce domaine comme l'eau distillée.*

Le vieillissement des solutions concentrées de sulfate de cuivre ne modifie pas sensiblement les taux auxquels, après dilutions extemporanées, elles sont actives.

FIXATION DES SELS DE CUIVRE SUR LES HÉMATIES. — Bien que tous les facteurs susceptibles d'entrer en jeu n'aient pas pu être précisés par ces expériences, il apparaît néanmoins évident que la présence spontanée ou expérimentale des sels de cuivre dans les solutions employées est de nature à provoquer l'agglutination des globules rouges.

Nous avons recherché, avec la collaboration de M^{lle} Berger, à qui nous exprimons tous nos remerciements, ce que devenait le cuivre introduit dans les suspensions d'hématies. L'expérience faite avec des suspensions agglutinées montre qu'il y a fixation élective du cuivre sur les hématies et que le liquide surnageant n'en renferme plus que des traces ; par contre, lorsqu'il n'y a pas agglutination, le cuivre est réparti entre le liquide et les hématies.

Exemple. — Nous préparons des solutions de sulfate de cuivre à différents taux et, après essai, retenons pour l'expérience la concentration de 1 mg. de sulfate par litre qui est la concentration la plus faible ayant provoqué une nette agglutination des hématies dans cette expérience.

Les hématies ainsi agglutinées sont séparées du liquide surnageant par centrifugation et le culot hématique soumis à la micro-analyse pour la recherche du cuivre. Le dosage indique la présence de 26 γ de cuivre. Par le calcul, nous savons que la quantité de cuivre mise au contact des hématies dans cette suspension (volume total retenu par l'expérience) est de 26 γ . *La totalité du cuivre mise en œuvre s'est donc fixée sur les hématies.* Il n'en est pas de même s'il n'y a pas eu agglutination.

Exemple. — On met les hématies en suspension dans une solution renfermant 0,6 mg. de sulfate de cuivre au litre. Il ne se produit pas d'agglutination des hématies. Les hématies sont centrifugées et recueillies.

Dosage du cuivre : hématies, 3 γ .

Or, le volume d'où sont extraites les hématies renfermait par calcul 16 γ de cuivre.

Il n'y a donc pas eu fixation de la totalité du cuivre sur les hématies.

Nous avons vu précédemment qu'il arrivait que des solutions de cuivre puissent, suivant le cas, provoquer ou ne pas provoquer l'agglutination des hématies. Avec un même taux de cuivre dans la suspension utilisée, on constate qu'il y a ou qu'il n'y a pas fixation du cuivre sur les hématies suivant qu'il y a ou qu'il n'y a pas eu agglutination.

Exemple. — On met en présence une suspension d'hématies et une solution à 1,8 mg. de sulfate de cuivre au litre.

a) Pour une raison indéterminée, *l'agglutination ne se produit pas.* On procède à l'analyse séparée du culot de centrifugation et du liquide surnageant.

Dosage du cuivre :

Hématies, 4 à 5 γ ; liquide surnageant, 42 γ .

Le total hématies + liquide était de 47 γ par calcul.

b) L'expérience est répétée avec une même solution et, cette fois, *il y a agglutination.*

Le dosage donne pour les hématies, une fois 44 γ , une autre fois 37 γ pour une quantité totale de cuivre (hématies + liquide) de 47 γ .

Ces expériences ont été répétées à multiples reprises avec des résultats concordants : l'agglutination des hématies sous l'influence

des sels de cuivre s'accompagne d'une fixation du cuivre sur ces dernières.

Enfin, opérant avec deux sels de Cu, sulfate et acétate neutre mis en quantités massives au contact d'hématies, nous avons constaté que seule une quantité constante de Cu est fixée par les hématies.

Exemple. — Agglutination de globules rouges de poule par les sels de cuivre comme ci-dessus.

Le taux des hématies est toujours de 0,3 p. 100. La solution de sulfate employée est cette fois de 13 mg. au litre et la solution d'acétate 4 mg. au litre, soit une teneur en cuivre pour 100 cm³ de 340 γ pour le sulfate et de 124 γ pour l'acétate. Dans les deux cas, nous trouvons fixés sur les hématies 74 γ de Cu.

Ces expériences montrent que 100 cm³ d'une suspension à 0,3 p. 100 d'hématies fixent au maximum 74 γ de Cu, quels que soient le sel employé et la quantité de Cu mise en solution.

FRACTION DES HÉMATIES FIXANT LE CUIVRE. — Il nous a paru intéressant de savoir sur quelle fraction de l'hématie se fixe le Cu : hémoglobine ou stroma ?

Nous avons fait une suspension à 0,3 p. 100 d'hématies dans 400 cm³ d'eau bidistillée contenant 0,8 mg. de sulfate de Cu ; après une heure trente de contact, nous avons centrifugé les hématies que nous avons laquées en eau bidistillée.

Après une nouvelle centrifugation, le culot formant une masse rose gélatineuse contenant le stroma et les noyaux est lavé deux fois. Le cuivre dosé dans les différentes fractions est réparti comme suit :

Liquide surnageant (Cu non fixé), 78 γ .

Hémoglobine, 108 γ .

Stroma, 32 γ .

(Le faible excès de Cu que nous trouvons (10 γ) n'est pas incompatible avec les erreurs de la technique.)

Par conséquent, *la plus grande partie du cuivre fixé l'est par l'hémoglobine, une fraction plus faible restant avec le stroma et les noyaux.*

Cet intéressant phénomène a été, par ailleurs, longuement analysé à l'occasion de nos recherches dans un travail de M. Macheboeuf et M^{lle} Berger (3) exposé à la même séance de la Société de Microbiologie que la présente étude et auquel nous renvoyons le lecteur pour plus amples détails.

PARALLÉLISME ENTRE L'AGGLUTINATION SPONTANÉE ET LA PRÉSENCE DU CUIVRE. — Est-ce bien à la présence du cuivre qu'il faut attri-

(3) M. MACHEBOEUF et H. BERGER, ces *Annales* (sous presse).

buer les résultats aberrants obtenus avec l'eau distillée vieillie ?

Pour élucider cette question, nous avons disposé l'expérience suivante :

On recueille, par saignée sur une poule, 7,5 cm³ de sang citraté, qui est aussitôt divisé en trois lots de 2,5 cm³ dans 3 tubes à centrifuger où les hématies vont subir 4 lavages et centrifugations opérés simultanément dans des conditions identiques, l'eau physiologique servant aux lavages variant seule, car on emploie dans le premier tube de l'eau bidistillée physiologique (non agglutinante), dans le deuxième de l'eau distillée physiologique préparée depuis cinq mois (fortement agglutinante), dans le troisième la même eau vieillie et restérilisée à l'autoclave le matin même (rendue moins agglutinante).

Les lavages terminés, les 3 culots d'hématies sont recueillis dans 3 microkjeldahls où l'on dose le cuivre, ainsi que dans un quatrième servant de témoin sans hématies.

Les taux de cuivre sont les suivants :

1 ^{er} tube (hématies lavées à l'eau bidistillée)	0
2 ^e tube (hématies lavées à l'eau distillée vieillie)	52 γ
3 ^e tube (hématies lavées à l'eau distillée vieillie et restérilisée)	1 γ
4 ^e tube (témoin sans hématies)	1 γ

Le vieillissement de l'eau distillée a donc pour effet de faciliter la fixation sur les hématies du cuivre qu'elle contient.

En conclusion, l'analyse des causes possibles d'erreurs dans la réaction d'agglutination des hématies par le virus de la grippe, montre que ces dernières sont apparemment multiples, mais sont vraisemblablement liées surtout à la présence du cuivre. Le vieillissement de l'eau distillée ordinaire (qui, nous le savons, renferme du cuivre) peut à lui seul entraîner, dans les conditions que nous avons étudiées, l'agglutination des hématies de façon plus ou moins aberrante ; cette action du vieillissement est supprimée, surtout lorsqu'elle n'est pas trop accusée, par la seule stérilisation à l'autoclave, et par le barbotage d'air comprimé. Il paraît logique de penser que ces différents facteurs agissent sur la stabilité des sels de cuivre présents dans l'eau.

L'eau rigoureusement bidistillée (ne renfermant aucun cuivre) n'est pas affectée des mêmes facteurs d'erreurs.

L'addition de quantités mesurées de sels de cuivre à une eau bidistillée provoque l'agglutination des hématies, mais les taux de sels de cuivre nécessaires sont eux-mêmes fonction de facteurs nombreux qui sont indépendants du pH des solutions ; la stérilisation des solutions de cuivre à l'autoclave inhibe leur pouvoir agglutinant.

Lorsqu'il y a agglutination des hématies, le cuivre en solution se fixe sur ces dernières. La présence de cuivre dans l'eau distillée

vieillie et agglutinante peut, de même, être mise en évidence par le lavage des globules rouges qui se chargent ainsi du cuivre.

Ces recherches soulignent l'importance de l'emploi, pour la pratique des réactions d'hémagglutination, d'une eau rigoureusement bidistillée (4).

(4) Depuis la rédaction de ce travail, nous avons eu connaissance d'une publication de P. H. ANDRESEN et V. FRIEDENREICH (*Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, 24, 394), où ces auteurs, étudiant les causes d'erreurs dans la détermination des groupes sanguins, rattachent ces dernières à la présence de métaux (Cu) dans l'eau distillée et montrent qu'elles ne peuvent être évitées que par l'emploi d'eau bidistillée dans un appareil de verre. Bien que les phénomènes observés par les auteurs scandinaves diffèrent dans leurs manifestations de ceux que nous avons étudiés, il n'est pas moins intéressant de les rapprocher pour souligner leur analogie qui rend vraisemblable leur identité essentielle.

Ajoutons enfin que c'est encore à la présence des traces de Cu dans les solvants que l'on a pu rapporter l'instabilité des sels de pénicilline obtenus au cours de leur préparation industrielle (A. CHAIN, *Conférence* à l'Institut Pasteur, 1948). On voit, par là, l'importance du rôle joué par le cuivre dans nombre de phénomènes restés jusqu'ici inexpliqués.

CODE DE NOMENCLATURE BACTÉRIENNE

Le Code de Nomenclature Bactérienne que nous publions ici est l'œuvre du Comité International de Nomenclature qui, depuis le 1^{er} Congrès International de Microbiologie de Paris, 1930, y travaille sans arrêt. Sa rédaction a été achevée par les soins du professeur Buchanan et du D^r Saint-John Brook en 1947 et revue par le Comité à Copenhague au cours du IV^e Congrès. Sa version anglaise a été acceptée à l'unanimité en séance plénière. La traduction en français a été faite par le D^r A.-R. Prévot et a été revue par le D^r A. Lwoff et le professeur P. Hauduroy, puis présentée au Comité, qui l'a acceptée.

Les Annales de l'Institut Pasteur ont été agréées pour sa publication (1). « La science est une langue bien faite » (Condillac). La rédaction des Annales est heureuse de contribuer à cet acte de discipline scientifique qui apportera certainement plus d'exactitude à la Bactériologie.

CHAPITRE I

Considérations générales.

1° Les progrès de la bactériologie peuvent être favorisés par un système précis de nomenclature qui doit s'articuler parfaitement avec les systèmes employés par les botanistes et les zoologistes et être accepté par la majorité des bactériologistes de tous les pays.

La nomenclature bactériologique englobe les bactéries, les micro-organismes apparentés et les virus, pour autant que ceux-ci relèvent de la nomenclature binaire. Les codes botaniques et zoologiques ont réglé la nomenclature de certains groupes : levures, champignons, algues et protozoaires. Ces groupes sont d'une importance telle pour les microbiologistes qu'un chapitre est nécessaire dans le code bactériologique pour régler les problèmes particuliers de leur nomenclature et assurer la coordination avec la nomenclature botanique et zoologique.

(1) Des tirés à part édités en brochure sous couverture spéciale seront mis à la disposition de tous les bactériologistes qui en feront la demande (50 francs l'exemplaire, expédition franco. S'adresser à la Rédaction des *Annales*).

2° Les préceptes sur lesquels le présent système de nomenclature bactériologique est fondé se divisent en principes, règles et recommandations.

Les principes (chapitre II) sont la base des règles et recommandations.

Les règles (chapitre III) sont rédigées pour rendre effectifs les principes énumérés au chapitre II, pour mettre de l'ordre dans les nomenclatures du passé et assurer l'avenir. Elles sont toujours rétroactives ; les noms et les formes contraires aux règles (noms ou formes illégitimes) ne peuvent être maintenus.

Les recommandations portent sur des questions subsidiaires. Leur but est d'apporter plus d'homogénéité et de clarté, en particulier dans la nomenclature future ; les noms et formes contraires aux recommandations peuvent ne pas être rejetés, mais sont cités comme des exemples à ne pas suivre.

Les dispositions pour l'amélioration des règles, pour certaines exceptions aux règles et pour leur interprétation dans les cas douteux sont étudiées par un Comité de Nomenclature constitué au sein de la Commission judiciaire de l'Association internationale des Microbiologistes.

CHAPITRE II

Principes généraux.

Principe 1 :

Les buts essentiels de la nomenclature sont :

1° Tendre à la fixité des noms.

2° Eviter ou rejeter l'usage de termes et de noms qui peuvent être des causes d'erreurs ou d'ambiguïtés et être une source de confusions.

3° Eviter la création de noms inutiles. La correction grammaticale absolue, la régularité ou l'euphonie des noms, les coutumes relatives à la priorité, la considération des personnalités, etc., bien que d'une importance indiscutable, sont néanmoins relativement secondaires.

(Voir règles 23, 24, 25, 26, 27 ; recommandations 27 a-i).

Principe 2 :

En l'absence d'une règle exprimée, ou quand l'interprétation d'une règle est douteuse, on doit se conformer aux coutumes établies. Dans les cas douteux, un résumé dans lequel tous les faits pertinents sont relatés doit être soumis à la commission judiciaire qui donnera son avis.

(Voir recommandation 9 c ; disposition 4.)

Principe 3 :

Les nomenclatures bactériologiques et botaniques sont interdépendantes : c'est-à-dire que le nom d'un groupe bactérien est à rejeter s'il est l'homonyme postérieur du nom d'un groupe botanique. De même, les nomenclatures des bactéries et des protozoaires sont interdépendantes : le nom d'un groupe bactérien est à rejeter s'il est l'homonyme postérieur d'un groupe de protozoaires. La nomenclature bactériologique est indépendante de la nomenclature zoologique (protozoologie exceptée) et le nom d'un groupe bactérien n'est pas à rejeter simplement par le fait qu'il est l'homonyme d'un nom de groupe du règne animal.

(Voir règle 24 [4°].)

Principe 4 :

Les noms scientifiques de tous les groupes sont habituellement formés à partir du latin ou du grec. Quand ils sont formés à partir d'une autre langue que le latin, ou bien formés d'une façon arbitraire, ils sont traités comme s'ils étaient latins. Les terminaisons latines doivent être employées, autant que possible, pour les noms nouveaux.

(Voir règles 1 à 8 ; 27 [6 c], 28 ; les recommandations 5 a, 6 a, 6 b, 8 a, 27 a-i.)

Principe 5 :

La nomenclature porte sur :

1° Les termes qui définissent le rang des groupes taxonomiques (espèce, genre, famille, ordre).

2° Les noms appliqués aux individus (*B. subtilis*, *Streptococcus*, *Spirillaceæ*, *Spirochaetales*).

(Voir principe 7 ; règles 1 à 8 ; recommandations 6 a à c ; 8 a, 24 a.)

Principe 6 :

Les règles et les recommandations de la nomenclature bactériologique sont appliquées à toutes les bactéries, aussi bien actuelles que fossiles, avec certaines exceptions distinctement spécifiées.

(Voir considérations générales : principe 9 ; dispositions 2-4.)

Principe 7 :

Les termes qui définissent le rang taxonomique des groupes sont ainsi définis :

a) Tout individu appartient à une espèce, toute espèce à un genre, tout genre à une famille, toute famille à un ordre, tout ordre

a) une classe, toute classe à une division. Dans quelques familles, l'échelon tribu peut être individualisé.

(Voir principe 5 ; Règles 1 à 8 ; recommandations 5 a, 6 a-c.)

b) Dans beaucoup d'espèces, on peut distinguer des sous-espèces ou des variétés. Dans quelques cas, la subdivision d'une espèce en *souches*, groupes, types sérologiques, variétés, phases ou autres subdivisions peut être admise. Dans quelques genres, des sous-genres peuvent être individualisés.

(Voir règles 6, 7 ; recommandations 6 a-c ; 8 a.)

c) Si un nombre plus grand de catégories intermédiaires (échelons) est nécessaire, les termes pour ces subdivisions sont faits par addition du préfixe « sous » au terme désignant l'échelon. Ainsi, « sous-famille » désigne un échelon entre famille et tribu ; « sous-tribu » un échelon entre tribu et genre, etc. La classification des échelons de toute nature peut être résumée ainsi :

1. Division (*Divisio*).
2. Subdivision (*Subdivisio*).
3. Classe (*Classis*).
4. Sous-classe (*Subclassis*).
5. Ordre (*Ordo*).
6. Sous-ordre (*Subordo*).
7. Famille (*Familia*).
8. Sous-famille (*Subfamilia*).
9. Tribu (*Tribus*).
10. Sous-tribu (*Subtribus*).
11. Genre (*Genus*).
12. Sous-genre (*Subgenus*).
13. Espèce (*Species*).
14. Sous-espèce (*Subspecies*).
15. Variété (*Varietas*).
16. Individu (*Individuum*).

d) La définition de chacune de ces catégories varie, dans une certaine mesure, avec les opinions individuelles de l'état de la science ; mais leur ordre réciproque, sanctionné par la coutume, ne doit pas être altéré. Aucune classification n'est admissible si elle repose sur une altération de cette hiérarchie.

Principe 8 :

Le but principal à atteindre quand on donne un nom à un groupe taxonomique n'est pas d'indiquer le caractère ou l'historique du groupe, mais de fournir un terme de référence.

(Voir règle 23.)

Principe 9 :

Tout groupe ayant des limites, une position ou un rang défini ne peut porter qu'un seul nom légal, qui est le premier en date

s'accordant avec les règles de la nomenclature. Des dispositions peuvent être prises pour certaines exceptions.

NOTE : Dans les sous-genres, les genres et dans les groupes de rang plus élevé, le nom légal (2) est le premier nom publié qui est en accord avec les règles de la nomenclature. Dans les espèces, le nom légal est la combinaison binominale, et dans les sous-espèces, la combinaison trinominale contenant la première épithète publiée qui soit en accord avec les règles de la nomenclature.

(Voir principe 6 ; règles 24-26 ; dispositions 2, 3 et 4.)

Principe 10 :

Les bactériologistes sont priés de ne pas changer un nom ou une combinaison de noms sans un motif sérieux, fondé soit sur une connaissance plus approfondie des faits, soit sur la nécessité de remplacer une nomenclature contraire aux règles.

Principe 11 :

L'emploi des noms de groupes taxonomiques est déterminé au moyen de types nominaux. Un type nominal est l'élément constituant d'un groupe auquel le nom du groupe est attaché de façon permanente, soit comme un nom admis, soit comme un synonyme. Le nom d'un groupe doit être changé si le type portant ce nom est exclu.

Le type d'un nom générique est une espèce, celui du nom d'une espèce ou d'une sous-espèce (variété) est, en général, une culture authentique, une souche ou une préparation. Dans quelques espèces, toutefois, le type peut être une description ou une figure donnée par un auteur antérieur. Quand l'entretien d'une culture ou la conservation d'un spécimen ou d'une préparation est impossible, le nom d'une espèce ou d'une subdivision de l'espèce est déterminé au moyen de la description ou de la figure originale.

NOTE : Le type nominal n'est pas nécessairement l'élément le plus typique ou le plus représentatif du groupe. Il est plutôt l'élément avec lequel le nom du groupe est associé de façon permanente.

EXEMPLES : Le type du genre *Bacillus* est l'espèce *B. subtilis*. Le type de *Pseudomonas suaveolens*, Soppeland, est la culture désignée et déposée par cet auteur comme culture-type à la col-

(2) Le nom légal (*valid name* dans le texte anglais) est par définition celui qui satisfait aux règles, énoncées dans le présent code, admises par l'Association internationale des Microbiologistes.

lection américaine de Cultures-types. Le type de *Actinomyces cameli* (Mason) Ford est constitué par sa description et l'illustration qui l'accompagne (*J. Trop. Med. Ther.*, 1919, **32**, 34) ; il n'existe pas de culture.

(Voir règle 9 ; recommandations 9 a-d.)

Principe 12 :

Le nom d'un groupe taxonomique n'a pas de statut et ne peut être reconnu par les bactériologistes tant qu'il n'a pas été publié légalement.

(Voir règles 10-14 ; recommandations 12 a-c.)

CHAPITRE III

Règles de nomenclature avec recommandations.

SECTION I. — NOMENCLATURE DES GROUPES DE RANGS DIVERS.

Règle 1.

Les noms de divisions, subdivisions, classes, sous-classes, ordres, sous-ordres, familles, sous-familles, tribus, et sous-tribus sont formés à l'aide d'un caractère important ou à partir d'une unité taxonomique du rang inférieur le plus proche.

Règle 2.

Les noms des échelons plus élevés que le genre sont employés au pluriel.

Règle 3.

Les noms de divisions, subdivisions, classes et sous-classes sont des mots d'origine latine ou grecque.

(Voir principes 4, 5, 7 ; règles 24 et 25.)

Règle 4.

Les noms d'ordres, de sous-ordres, familles et sous-familles sont également des mots d'origine latine ou grecque, ou des mots latinisés, ayant chacun un suffixe indiquant leur rang taxonomique. Le suffixe pour les ordres est *-ales* ; pour les sous-ordres, *-ineæ*, pour les familles *-aceæ*, pour les sous-familles *-oideæ*, pour les tribus *-eæ*, pour les sous-tribus *-inæ*.

(Voir principes 4, 5, 7 ; règles 22, 24, 25.)

Règle 5.

Les noms de genres et de sous-genres sont des substantifs (ou des adjectifs employés comme substantifs) mis au singulier et écrits avec une initiale majuscule. Ces noms peuvent être formés de n'importe quelle façon et même composés de manière arbitraire. Ils se comportent comme des substantifs latins. Les noms génériques et sous-génériques sont soumis aux mêmes règles et recommandations et du point de vue de la nomenclature, sont coordonnés.

EXEMPLES : *Bacillus*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Alcaligenes*, *Fusiformis*.

(Voir principes 4, 5, 7.)

Si un genre est divisé en sous-genres, un des sous-genres (celui qui comprend le type du genre) doit porter le même nom que le genre.

EXEMPLE : Si le genre *Bacillus* est divisé en 2 ou plusieurs sous-genres, le sous-genre qui comprend l'espèce-type *B. subtilis* doit porter le nom sous-générique *Bacillus*.

(Voir règles 9, 19, 20, 27, 28 ; recommandations 9 a-c ; 19 a ; 27 i.)

RECOMMANDATIONS 5 a. — Les bactériologistes qui forment des noms génériques ou sous-génériques nouveaux doivent suivre les recommandations suivantes :

1. Ne pas composer de noms longs ou difficiles à prononcer.
2. Choisir des noms de tournure agréable, facilement adaptables au latin.
3. Ne pas dédier de genres à des auteurs sans rapport avec la bactériologie ou les sciences naturelles, ou à des personnes inconnues.
4. Éviter les adjectifs employés substantivement.
5. Ne pas composer de noms par combinaison de langues différentes (*Nomina hybrida*).
6. Donner une tournure féminine aux termes génériques formés à partir d'un nom propre, que ce soit celui d'un homme ou d'une femme.

(Voir principes 4, 7 ; règle 27 ; recommandations 27 a-i pour l'orthographe et le genre des noms génériques.)

Règle 6.

Les noms d'espèces sont des combinaisons binaires comprenant le nom du genre suivi par une épithète spécifique unique (3).

Si une épithète comprend deux ou plusieurs mots, ceux-ci

(3) Le terme « épithète » signifie un mot descriptif unique ou une phrase descriptive unique. Exemple : le mot latin *aureus* (doré) est un

doivent être réunis ou reliés par un trait d'union. Les épithètes spécifiques sont :

a) Les adjectifs s'accordant grammaticalement avec le nom générique.

EXEMPLE : *B. subtilis*, *M. aureus*, *Clostridium botulinum*.

b) Des substantifs au nominatif en apposition avec le nom générique.

EXEMPLE : *Flavobacterium ceramicola*, *Vibrio comma*, *Pseudomonas conjac*, *Phytomonas holcicola*.

c) Des substantifs au génitif. EXEMPLES : *Phytomonas vasculorum*, *Aerobacter cloacae*, *Rhizobium leguminosarum*, *Brucella abortus*, *Acetobacter aceti*, *Salmonella anatis*, *Borrelia kochii*.

A l'intérieur d'un même genre, deux espèces ne peuvent pas porter la même épithète spécifique.

(Voir principes 4, 5, 7 ; règle 27 ; recommandations 27 a-i pour l'orthographe et le genre des noms spécifiques.)

RECOMMANDATION 6 a. -- Quand on désire indiquer le nom d'un sous-genre, en rapport avec le nom du genre et l'épithète spécifique, le nom du sous-genre peut être placé entre parenthèses entre les deux premiers.

EXEMPLE : *Lactobacillus (Thermobacterium) caucasicus*.

(Voir principes 4, 5, 7.)

RECOMMANDATIONS 6 b. — Pour former l'épithète spécifique, les bactériologistes doivent suivre les recommandations suivantes :

1° Le nom spécifique doit, en général, fournir quelque indication sur la forme, le caractère, l'origine, l'histoire ou les propriétés de l'espèce. Si le nom spécifique est formé à partir d'un nom propre de personne, la personne choisie doit être de préférence celle qui l'a découverte ou décrite ou qui a contribué à sa découverte ou à sa connaissance.

EXEMPLES : *Micrococcus aureus*, *Clostridium pasteurianum*, *Phytomonas campestris*, *Bacillus viscosus*, *Kurthia zopfii*.

adjectif descriptif unique ou épithète et le nom d'espèce *Micrococcus* est correct. La phrase *lactacidum* est une épithète simple et le nom *Streptococcus lactis-acidi* (ou *lactisacidi*), streptocoque du lait sûr, est correct. Par contre on ne doit pas accepter une suite de mots sans rapport entre eux comme une épithète simple. Ainsi le nom spécifique *Bacillus aureus lactis*, bacille doré du lait, est un trinome illégal, car il est composé de deux épithètes spécifiques. Ce nom ne peut être rendu valable par un trait d'union placé entre les deux noms spécifiques car ce sont deux épithètes indépendantes. Au contraire, si les deux noms sont combinés comme suit : *Bacillus aurei-lactis*, le nom est complètement changé et devient *bacille du lait doré* : le nom spécifique est correct, mais il ne devrait être appliqué qu'à un organisme qui colore le lait en doré.

2° Eviter les noms trop longs ou difficiles à prononcer.

3° Eviter les noms qui expriment un caractère commun à toutes ou presque toutes les espèces du genre.

EXEMPLE : *Micrococcus sphericus*.

4° Eviter les noms de localités peu connues ou trop petites, sauf si l'espèce est très localisée.

5° Eviter, dans le même genre, des noms spécifiques trop semblables, surtout ceux qui ne diffèrent que par leurs dernières lettres.

6° Ne pas adopter de noms inédits trouvés dans les notes d'un auteur en les attribuant à cet auteur, à moins que celui-ci n'en ait approuvé la publication.

(Voir principes 4, 5, 7.)

RECOMMANDATION 6 c. — Les noms d'hommes, de femmes et de localités ou de pays employés comme épithètes spécifiques peuvent être des substantifs au génitif (*sordellii*) ou adjectifs (*pasteurianum*, *japonicum*). Il est souhaitable dans l'avenir d'éviter d'employer la même épithète au génitif ou sous forme adjectivale pour désigner des espèces différentes du même genre.

(Voir principes 4, 5, 7.)

Règle 7.

Les noms de sous-espèces (variétés) sont des combinaisons ternaires comprenant le nom du genre suivi des épithètes spécifiques et sous-spécifiques dans l'ordre.

EXEMPLE : *Escherichia coli* subsp. *communior* (Topley and Wilson) Breed et al. ; ou *Escherichia coli* var. *communior*, ou *Escherichia coli communior*. Ceci ne doit pas justifier le nom de *Bacillus fluorescens liquefaciens* car ce nom a été primitivement proposé comme combinaison trinominale pour une espèce, et non pour une sous-espèce ou une variété.

Les noms de sous-espèces ou de variétés sont formés comme ceux des espèces ; quand ils sont sous la forme adjectivale et non employés comme substantifs, ils s'accordent en genre avec le nom générique.

Deux sous-espèces de la même espèce ou du même genre ne peuvent pas porter la même épithète sous-spécifique.

Quand l'espèce est divisée en sous-espèces, l'épithète sous-spécifique de la sous-espèce qui comprend le type de l'espèce doit être la même que celle de l'espèce.

EXEMPLE : Si *Micrococcus aureus* est divisé en deux ou en plusieurs sous-espèces, l'une (celle qui comprend le type), doit être désignée *Micrococcus aureus* subsp. *aureus*.

(Voir principes 4, 5, 7.)

Règle 8.

Les subdivisions de l'espèce (autres que les sous-espèces ou variétés) sont désignées, ou par des noms vulgaires, ou par des numéros, des lettres ou, dans des cas spéciaux, par des noms de forme latine.

(Voir principes 4, 5, 7.)

RECOMMANDATIONS 8 a. — Les auteurs de noms de subdivisions d'espèce qui ne sont pas traitées comme sous-espèces ou variétés doivent suivre les recommandations et définitions suivantes :

1° Une souche est une culture pure de bactéries issue de la descendance d'un isolement unique. Elle est fréquemment désignée par le nom de l'auteur responsable de cet isolement, comme par exemple *Corynebacterium diphtheriae*, souche Park-William.

Elle peut aussi être désignée par la localité ou par un numéro ou par quelque marque caractéristique d'un laboratoire.

Les souches peuvent aussi être utilisées pour désigner des cultures de bactéries correspondant aux variétés cultivées des plantes supérieures et ayant quelque signification économique. Elles sont fréquemment désignées par le nom du laboratoire ou de l'établissement où elles ont été isolées, comme *Acetobacter aceti*, souche Carlsberg.

2° Le terme « type » a été fréquemment utilisé pour désigner une subdivision d'espèce, particulièrement dans les cas où les caractères différentiels sont insuffisants pour en justifier l'érection en sous-espèce ou variété. Les types sont souvent différenciés par leurs caractères antigéniques. Le type est parfois utilisé pour désigner une variante physiologique ou morphologique. Quand « type » est employé dans un sens différent de celui défini par le principe 11, il est préférable que les termes sérotype (ou types sérologiques), biotype (ou type physiologique) et morphotype (ou type morphologique) puissent être substitués de façon appropriée à « type » comme désignation d'une subdivision de l'espèce.

3° Le terme « groupe » doit être employé avec discernement pour éviter toute ambiguïté. Il est employé généralement pour désigner divers organismes ayant des caractères communs (ex. : Groupe *coli-aerogenes*) et au sens restreint en analyse antigénique pour désigner des espèces ou des sous-genres (ex. : *Streptococcus* Groupe A Lancefield), des variétés ou des sous-espèces (ex. : *Neisseria intracellularis* Groupe I Scott). Il est souhaitable que le terme « groupe » soit réservé aux divisions sérologiques primaires et désigné par une lettre majuscule. Toute subdivision sérologique à l'intérieur d'un groupe doit être désignée comme type et carac-

térisée par des chiffres arabes [ex. : *Bacterium pseudotuberculosis-rodentium*, Groupe A, type I, Schutze] (4).

4° La désignation *phase* doit être réservée aux bactéries montrant certaines caractéristiques immunologiques variables, particulièrement les phases spécifiques et non spécifiques d'Andrewes pour le genre *Salmonella*.

EXEMPLE : *Salmonella enteritidis*, phase spécifique.

5° Une « forme » (*forma*) ou « forme spéciale » (*forma specialis*) est une subdivision d'une espèce de microorganisme parasite qui se distingue par adaptation à un hôte particulier. Il faut la nommer de préférence en lui donnant le nom scientifique de l'hôte. On l'emploie principalement au génitif.

EXEMPLE : *Rhizobium phaseoli*, forme *phaseoli multiflori* ou *Rhizobium phaseoli* f. sp. *phaseoli multiflori*.

6° Un variant d'un organisme est une forme présentant un changement d'un ou plusieurs caractères de la souche originale. Les variants résultent fréquemment d'une mutation. S'il est suffisamment distinct et stable, le variant peut être considéré comme une sous-espèce ou une variété et traité en conséquence.

Exemple de variant : la descendance d'un secteur non coloré d'une colonie pigmentée, ou la descendance d'une colonie secondaire survenant comme mutant fermentant le lactose à partir des colonies fermentant le glucose.

EXEMPLE : *Shigella sonnei*, variante fermentant le lactose.

7° On réserve généralement le nom de phase, stade, état ou forme aux variants rugueux, lisses, mucoïdes ou autres qui peuvent apparaître dans les cultures de nombreuses espèces bactériennes. On considère que la variation est souvent réversible. Certains auteurs l'interprètent comme la manifestation d'un cycle vital pléomorphique. Les variants peuvent être désignés par quelque nom vulgaire descriptif.

(4) On pourrait craindre que si les noms spécifiques sont substitués aux lettres actuellement employées pour désigner les groupes, le concept sérologique ne soit obscurci et qu'il soit difficile d'amener les sérologistes travaillant dans diverses directions, à accepter une méthode qui puisse paraître rétrograde. Mais cette procédure a été acceptée par le Sous-Comité des *Salmonella* pour les cas du genre *Salmonella*. Toutefois tous les chercheurs dans ce domaine sont familiarisés avec le schéma de Kauffmann-White, qui montre clairement les variations de la constitution antigénique des espèces constituant le genre. Une procédure analogue pourrait être employée, par exemple, pour les streptocoques ; un schéma pourrait montrer les relations antigéniques à l'intérieur des divers groupes qui seraient élevés au rang d'espèce et pourvus de noms obéissant aux lois de la priorité. Le Sous-Comité des *Salmonella* a fait à ce sujet un effort pour concilier les traditions du passé avec le besoin pratique actuel de reconnaître les relations sérologiques, lorsqu'elles existent.

EXEMPLE : *Bacillus subtilis*, forme rugueuse.
(Voir principes 4, 5, 7 b.)

SECTION 2. — DÉSIGNATION DE TYPES DE NOMENCLATURE.

Règle 9.

Pour chaque nom légal de chaque groupe taxonomique, il faut désigner le type. Pour chaque espèce ou sous-espèce, c'est une culture type, un spécimen ou une description ; pour chaque genre, une espèce type [génotype].

(Voir principe 11 ; règle 5.)

RECOMMANDATION 9 a. — En publiant les noms de nouveaux groupes taxonomiques, les auteurs doivent indiquer soigneusement la subdivision qui est le type du nom nouveau : l'espèce type (génotype) du genre, la sous-espèce, type ou variété d'une espèce dans lesquelles les subdivisions sont reconnues, le spécimen, la préparation ou la description. Ce type détermine l'application du nom au cas où le groupe taxonomique est divisé ultérieurement. Dans la description d'espèces nouvelles, de variétés ou de formes de bactéries parasites, l'hôte du type doit être indiqué.

(Voir principe 11 ; règle 5.)

RECOMMANDATION 9 b. — Quand on révisé un genre pour lequel le génotype n'a pas été défini, l'auteur de la révision désigne l'espèce qu'il considère comme type du point de vue de la nomenclature.

(Voir principe 11 ; règle 5.)

RECOMMANDATION 9 c. — En choisissant une espèce type pour la nomenclature (génotype) d'un genre de bactéries, les bactériologistes doivent, dans la mesure du possible, tout en se conformant aux règles admises, exercer leur choix de telle façon que le nom générique corresponde à l'usage courant.

(Voir principes 2, 10 ; règle 5.)

RECOMMANDATION 9 d. — L'importance la plus grande doit être accordée à la conservation du matériel original (« type ») sur lequel la description du nouveau groupe est fondée. L'exposé original doit indiquer où le matériel peut être trouvé. Quand une nouvelle espèce ou sous-espèce de bactérie est décrite, si le microbe peut être maintenu en culture pure, une culture authentique prise comme type doit être déposée dans l'une des collections nationales ou internationales. Les collections nationales ou

internationales de types microbiens sont désignées par le Comité International de Nomenclature. En 1939, les deux collections reconnues au Congrès de New-York sont : la collection nationale de cultures types du Lister Institute de Londres, et l'American types Culture Collection de Washington. Etant donné que le type de l'espèce bactérienne correspond le plus souvent à la description et aux figures publiées, les publications doivent être aussi précises et aussi complètes que possible.

NOTE. — Il est rappelé que des modifications morphologiques, biochimiques et antigéniques et aussi une perte de la virulence peuvent être la conséquence de repiquages fréquents. Ces modifications peuvent être parfois évitées dans une certaine mesure par la dessiccation des cultures dans un vide poussé, effectuée dans des conditions favorables ; les bactéries ainsi desséchées peuvent servir de souche de référence.

(Voir principe 11.)

SECTION 3. — PUBLICATION DES NOMS.

Règle 10.

La Nomenclature bactériologique légale commence avec les «*Species Plantarum* » de Linné, 1^{re} édit., 1753 (5).

(Voir principe 12.)

Règle 11.

Une publication devient valable par la mise en vente ou la distribution de textes imprimés au public ou aux instituts de bactériologie. Aucune autre sorte de publication n'est considérée comme effective ; la communication de noms nouveaux à un Congrès public, ou l'enregistrement de noms dans une collection ne constituent pas une publication valable. Quand des tirés à part de périodiques ou d'autres ouvrages sont mis en vente ou distribués avant la publication dont elles sont extraites, la date portée par les tirés à part est acceptée comme une date effective de publication.

La date d'acceptation d'un article pour sa publication, telle qu'elle est indiquée par le périodique n'est pas la date effective de la publication et n'a pas de valeur pour la détermination de la priorité du nom.

(Voir principe 12 ; règle 12.)

(5) Fixée par la Session plénière du 1^{er} Congrès International de Microbiologie, Paris 1930. Comptes rendus, 2^e vol., p. 527.

Règle 12.

Le nom d'un groupe taxonomique n'est pas publié légalement tant qu'il n'est pas publié effectivement (voir règle 11) et accompagné par la description du groupe ou par la référence à une description antérieure et effective. Les mots « légal » ou « légalement publiés » employés dans ces règles signifient « ayant rang en nomenclature, » et les mots « illégal » ou « non légalement publiés » signifient « n'ayant pas rang en nomenclature ». La mention d'un nom sur une étiquette de culture ou de préparation de bactéries dans une collection sans description imprimée ou manuscrite ne constitue pas une publication légale de ce nom.

Le nom d'un groupe taxonomique n'est publié légalement que s'il a été proposé de façon ferme par l'auteur qui l'a publié. Un nom proposé provisoirement (*nomen provisorium*), par anticipation d'une acceptation éventuelle du groupe, de la limitation de ce groupe ou de la position, ou du rang à lui assigner, ou encore mentionné incidemment n'est pas considéré comme publié légalement.

EXEMPLE : Beijerinck (*Arch. neerl. d. sc. exactes*, 1903, sec. 2, vol. VIII, 217) mentionne dans une note de bas de page de l'article où il décrit et nomme le genre *Azotobacter* que *Parachromatium* pourrait être un nom valable. Ce nom n'ayant pas été proposé ni adopté, n'a pas de place en nomenclature.

Le nom d'un groupe taxonomique n'est pas publié légalement quand il est cité comme synonyme.

EXEMPLE : Trevisan (*Rendiconti Real, Ist Lombard, d. Sci. e Lett.*, 1879, série 2, vol. XII, 144) cite *Malleomyces equestris* Hallier comme un synonyme de *Micrococcus equestris* qui est considéré comme agent étiologique de la morve. Comme toutes les espèces de Hallier ont été décrites d'après des cultures mixtes, les noms proposés sont illégaux, et les citations incidentes de Trevisan comme synonyme ne légitiment pas le nom. *Malleomyces* prend date comme nom générique à partir de la proposition de Pribram de 1933 (*Klassifikation der Schizomyceten*, 93).

Un groupe n'est pas caractérisé et la publication de son nom n'est pas avalisée par la mention des sous-groupes qu'il comprend. Ainsi la publication du nom d'un ordre n'est pas validée par la mention des familles qu'il comprend ; celle d'une famille n'est pas validée par la mention des sous-familles qu'elle comprend ; celle d'une famille n'est pas validée par la mention des genres inclus ; celle d'un genre n'est pas validée par la mention des espèces incluses.

La date d'un nom ou d'une épithète est celle de sa publication légale. Pour les questions de priorité, toutefois, seuls les noms légitimes et les épithètes publiées en combinaisons légitimes sont

pris en considération. En l'absence de preuve du contraire, la date donnée dans l'ouvrage contenant le nom ou l'épithète doit être considérée comme légale.

(Voir principe 12 ; règle 27 ; note 1.)

EXEMPLE : *Chondromyces crocatus* Berkeley et Curtis, 1857 (in Berkeley, *Introduction to Cryptogamic Botany*, 313) est un nom apposé à une figure, sans description. La description a été publiée plus tard (Berkeley : *Grevillea*, 1874, vol. III, 64) ; la publication légale est celle de cette dernière date.

RECOMMANDATION 12 a. — Lorsque des noms de groupes nouveaux de bactéries sont publiés dans des ouvrages écrits en une langue peu usitée, il est recommandé à l'auteur de publier en même temps la diagnose dans une langue d'usage courant.

(Voir principe 12.)

RECOMMANDATION 12 b. — Les auteurs devraient indiquer exactement la date de leurs publications. Dans le cas d'un ouvrage paraissant en livraisons séparées, le dernier fascicule publié devrait porter l'indication de la date précise à laquelle les différents fascicules ou livraisons ont été publiés, de même que le nombre de pages de chacun d'eux.

(Voir principe 12.)

RECOMMANDATION 12 c. — Quand des travaux sont publiés dans des périodiques, l'auteur doit exiger de l'éditeur l'indication sur les tirés à part de la date (année, mois et jour) de la publication et le titre du périodique duquel le travail est extrait. Les tirés à part doivent avoir la même pagination que le périodique, mais ils peuvent porter en plus une pagination propre.

(Voir principe 12.)

Règle 13.

Le nom d'un genre n'est pas considéré comme publié légalement tant qu'il n'est pas accompagné par une description du genre, ou par une citation d'une description antérieure, publiée légalement, de ce genre sous un autre nom ; ou encore par la référence à une description antérieure et légalement publiée du genre considéré comme sous-genre, ou d'une autre subdivision du genre.

Le nom d'un nouveau genre, monotypique, basé sur une nouvelle espèce, est avalisé par une description générique et spécifique combinée.

(Voir principe 12.)

EXEMPLE : *Bacillus* Cohn, 1872 ; *Pasteurella*, 1885 ; *Sarcina* Goodsir, 1942 ; *Polyangium* Link, 1809.

Règle 14.

Le nom d'une espèce ou d'une sous-espèce (variété) n'est pas légalement publié tant qu'il n'est pas accompagné par la description du groupe, ou par la citation d'une description antérieure légalement publiée du groupe sous un autre nom.

(Voir principe 12.)

EXEMPLE : *Bacillus subtilis* Cohn, 1872.

SECTION 4. — CITATION DES AUTEURS DE NOMS.

Règle 15.

Pour que le nom (unique, binaire ou ternaire) d'un groupe soit approprié et complet et afin que la date puisse en être vérifiée rapidement, il est nécessaire de citer l'auteur qui a le premier publié le nom en question.

EXEMPLE : *Plocamobacteriales* Pribram (ou Pribram, 1933), *Proteus* Hauser (ou Hauser, 1885), *Serratia marcescens* Bizio (ou Bizio, 1823).

Une modification des caractères diagnostiques ou de la délimitation d'un groupe sans exclusion du type, n'implique pas le maintien d'autres noms que celui de l'auteur qui le premier a publié le nom du groupe. Quand les modifications ont été considérables, l'indication de leur nature et de l'auteur responsable de cette modification doit être ajoutée de la façon suivante : *em.* (*emendavit*) ou *mutatis charact.*, ou *pro parte*, ou *excl. gen.*, *excl. sp.*, *excl. var.* ou toute autre abréviation indiquant la nature de la modification.

EXEMPLE : *Bacillus* Cohn *em.* Migula.

Quand le nom d'un groupe taxonomique a été proposé par un auteur, mais non légalement publié et qu'il est ensuite valablement publié par un autre auteur qui en attribue la paternité au premier descripteur, le nom de celui-ci, précédé de *ex.*, doit être ajouté à la citation.

S'il est désirable ou nécessaire d'abrégier cette citation, le nom de l'auteur de la publication valable étant le plus important, doit seul être retenu.

EXEMPLE : *Salmonella dar-es-salaam* Schutze *ex.* Brown, Duncan et Henry.

Quand un nom et la description d'un auteur sont publiés par un autre auteur, le mot *apud* est employé pour relier les noms des deux auteurs, sauf quand le nom du deuxième auteur fait partie du titre d'un livre ou d'un périodique, auquel cas le mot *in* est utilisé.

Règle 16.

Quand la position systématique d'un genre, sous-genre, espèce ou sous-espèce (variété) est modifiée, mais que le nom est conservé, l'auteur original doit être cité entre parenthèses, et son nom suivi de celui qui a effectué la modification. La même règle doit être appliquée quand un sous-genre, une espèce ou une sous-espèce sont transférés à un autre genre ou espèce sans modification de hiérarchie.

EXEMPLE : *Spirochaeta pallida* Schaudinn et Hoffman devient *Treponema pallidum* (Schaudinn et Hoffman) Schaudinn.

RECOMMANDATION 16 a. — Quand on cite un synonyme, les mots « synonymes » ou « pro synonym. » doivent être ajoutés à la citation.

Quand un auteur publie en le considérant comme synonyme un nom pris dans le manuscrit d'un autre auteur, le mot *ex* doit être utilisé pour relier les noms des deux auteurs.

RECOMMANDATION 16 b. — Quand on cite comme synonyme de nom invalidé par un homonyme antérieur la citation doit être suivie par le nom de l'auteur de l'homonyme antérieur précédé de « non » et si possible de la date de la publication. Dans quelques cas, il est préférable de citer aussi les homonymes postérieurs.

EXEMPLE : *Myzococcus* Gonnerman 1907 *non* Thaxter 1892.

SECTION 5. — CHANGEMENT DE NOM RÉSULTANT DE LA SÉGRÉGATION
OU DE LA RÉVISION DE GROUPES OU DE MODIFICATION DE POSITION.

Règle 17.

Une modification des caractères diagnostiques ou de la limitation d'un groupe ne doit pas amener le changement de son nom, excepté si c'est motivé : 1° par un transfert de groupe ; 2° par un changement de position.

Quand un genre est divisé en deux ou en plusieurs genres, le nom générique original doit être retenu pour l'un d'eux (et, s'il n'a pas été retenu, il doit être rétabli).

Quand une espèce particulière a été désignée originellement comme type, le nom générique doit être conservé pour le genre comprenant cette espèce. Quand il n'y a pas eu de type désigné, il faut en choisir un.

EXEMPLE : Donker (1926) divise le genre *Bacillus* en *Bacillus* et *Aërobacillus* et retient *Bacillus* pour le genre qui comprend l'espèce-type *B. subtilis*.

La même règle est appliquée quand un sous-genre est divisé en deux ou plusieurs sous-genres.

Règle 18.

Quand une espèce est divisée en deux ou plusieurs espèces, l'épithète spécifique doit être conservée pour l'une d'entre elles (ou si elle n'a pas été conservée doit être rétablie). Quand un spécimen particulier a été originellement désigné comme type, l'épithète spécifique peut être retenue pour l'espèce comprenant le spécimen. Quand il n'y a pas eu de type désigné, un type doit être choisi en accord avec les règles.

La même règle doit être appliquée aux sous-espèces (variétés) quand celles-ci sont subdivisées en deux ou plusieurs sous-espèces.

EXEMPLE : Quand *Rhizobium leguminosarum* Frank fut divisé en plusieurs espèces, toutes symbiotiques des racines des légumineuses, le nom *R. leguminosarum* fut correctement retenu pour l'une d'elles par Fred.

Quand une espèce est transférée à un autre genre, (ou placée sous un autre nom générique du même genre) sans changement de position, l'épithète spécifique doit être retenue, ou (si elle n'a pas été retenue) doit être rétablie à moins que l'un des obstacles suivants n'existe : 1° que le binôme résultant soit un homonyme postérieur ou tautonyme ; 2° qu'il existe une épithète spécifique valable, antérieurement publiée.

Quand l'épithète spécifique, au cours d'un transfert à un autre nom générique, a été appliquée par erreur dans sa nouvelle position à une espèce différente, la nouvelle combinaison peut être retenue pour l'organisme pour lequel l'épithète a été originellement créée.

Règle 19.

Quand deux ou plusieurs groupes de même rang sont réunis on doit retenir le nom légitime le plus ancien ou (pour l'espèce et ses subdivisions) l'épithète légitime la plus ancienne ; si les noms ou les épithètes ont la même date, l'auteur qui a réuni le groupe a le droit de choisir l'un d'eux. L'auteur qui le premier a adopté l'un d'eux traitant définitivement l'autre comme synonyme ou le référant à un groupe d'ordre inférieur, doit être suivi.

(Voir règle 5.)

RECOMMANDATIONS 19 a. — Les auteurs ayant à choisir entre deux noms génériques doivent suivre les recommandations suivantes :

1° Parmi deux noms de même date, préférer celui qui a été le premier accompagné de la description de l'espèce.

2° Parmi deux noms de même date, tous deux accompagnés des descriptions spécifiques, préférer celui qui comprend le plus grand nombre d'espèces au moment où l'auteur a fait son choix.

3° En cas d'équivalence complète, préférer le nom le plus court et le plus approprié.

(Voir règle 5.)

Règle 20.

Quand plusieurs genres sont réunis en tant que sous-genres sous le même nom générique, le sous-genre comprenant le type du nom générique doit conserver son nom inchangé.

(Voir règle 5.)

Règle 21.

Quand plusieurs espèces sont réunies en tant que sous-espèces ou variétés sous un nom spécifique, la subdivision qui comprend le type de l'épithète spécifique utilisée peut être désignée par la même épithète inchangée.

Règle 22.

1° Quand une sous-tribu devient une tribu, quand une tribu devient une sous-famille, quand une sous-famille devient une famille, etc., ou quand l'inverse survient, le radical du nom ne doit pas être changé mais seulement la terminaison (*-inæ*, *-eæ*, *-oideæ*, *-aceæ*, *-inex*, *-ales*, etc.).

2° Quand un sous-genre devient un genre ou l'inverse, le nom original est inchangé.

3° Quand une subdivision d'espèce devient une espèce ou l'inverse, l'épithète originale doit être retenue à moins que la combinaison qui en résulte ne doive être rejetée.

(Voir règles 3 et 4 et section 6.)

SECTION 6. — REJET ET SUBSTITUTION DE NOMS.

Règle 23.

Un nom ou une épithète ne doivent pas être rejetés, changés ou modifiés simplement parce qu'ils sont mal choisis ou parce qu'un autre est préférable ou mieux connu.

(Voir principes 1, 8, 10.)

Règle 24.

Un nom peut être rejeté s'il est illégitime, c'est-à-dire s'il est contraire à une règle. La publication d'une épithète dans une combinaison illégitime ne doit pas être prise en considération même si elle a la priorité.

(Voir principe 1 ; règles 1 à 4.)

Le nom d'un groupe taxonomique est illégitime dans les cas suivants :

1° S'il était superflu du point de vue de la nomenclature au moment où il a été publié, c'est-à-dire, si le groupe auquel il était appliqué, tel qu'il a été délimité par ses auteurs, comprenait le type d'un nom que l'auteur aurait dû adopter selon l'une des règles.

EXEMPLE : *Dicrobactrum* Enderlein 1917 est superflu à cause de la publication antérieure de *Serratia* Bizio 1823.

2° Si c'est un nom binaire ou ternaire publié en contravention des principes 9 et des règles 17-23, c'est-à-dire, si l'auteur n'accepte pas l'épithète légitime antérieure, valable pour le groupe, avec sa délimitation particulière, sa position et son rang.

3° Si son épithète spécifique doit être rejetée en raison de l'application de la règle 25.

4° Si c'est un homonyme postérieur d'un genre bactérien ou d'un genre de protozoaire, c'est-à-dire, si c'est le duplicata d'un nom antérieurement et valablement publié pour un groupe de même rang fondé sur un type différent. Même si l'homonyme antérieur est illégitime ou est généralement considéré comme un synonyme sur la base taxonomique, l'homonyme postérieur doit être rejeté. Quand un auteur publie simultanément le même nom nouveau pour plus d'un groupe, le premier auteur qui adopte l'un d'eux ou substitue un autre nom à l'un d'entre eux doit être suivi.

RECOMMANDATION 24 a. — Les auteurs doivent éviter d'introduire en bactériologie un nom générique déjà employé en zoologie. (Voir principe 5.)

NOTE. — De simples variantes orthographiques d'un même nom sont traitées comme des homonymes quand elles correspondent à des types différents.

(Voir règle 28.)

5° Si, par suite de ségrégation, le nom d'un groupe est employé avec différents sens, et devient ainsi une source permanente de confusion et d'erreur. Une liste de noms à abandonner pour ces raisons est publiée sous la rubrique *Nomina rejicienda*.

(Voir principe 3 ; décision 3.)

6° Si son application est douteuse (*nomen dubium*). Une liste de noms à abandonner pour cette raison sera comprise dans les *Nomina rejicienda*.

(Voir décision 3.)

7° Si la caractérisation du groupe est basée sur une culture impure ou mixte. Une liste de noms à abandonner pour cette raison (*Nomina confusa*) sera comprise dans les *Nomina rejicienda*.

(Voir décision 3.)

EXEMPLE : Les caractères du genre *Malleomyces* Hallier 1870 proviennent de divers champignons et bactéries supposés à tort représenter les formes de croissance d'un seul microbe. Le nom de *Salmonella tokio* Aoki est basé sur une culture mixte.

8° S'il est fondé sur une anomalie.

EXEMPLE : Une colonie de *Shigella dysenteriae* lysée par un bactériophage serait une anomalie de cette sorte.

Règle 25.

Sont illégitimes et doivent être rejetées les épithètes correspondant aux cas suivants :

1° Quand ce sont des mots simples non érigés en noms.

2° Quand ce sont de simples adjectifs ordinaux employés pour l'énumération.

3° Quand ils répètent exactement le nom générique. (Tautonymes).

(Voir principes 1, 9 ; règles 1, 2.)

Règle 26.

Les noms et épithètes à rejeter en vertu des règles 23-25 sont remplacés par le nom légitime le plus ancien, ou, dans une combinaison, par l'épithète légitime la plus ancienne qui sera, dans la nouvelle position, en accord avec les règles. S'il n'en existe aucune, un nouveau nom ou une nouvelle épithète doivent être choisis. Quand une nouvelle épithète est nécessaire, un auteur peut, s'il le veut, adopter une épithète antérieurement donnée au groupe dans une combinaison illégitime, s'il n'existe aucun obstacle à son utilisation dans sa nouvelle position ou son nouveau sens.

(Voir principes 1, 9.)

SECTION 7. — ORTHOGRAPHE ET GENRE DES NOMS.

Règle 27.

L'appellation originale d'un nom ou d'une épithète doit être conservée, sauf dans le cas d'une erreur typographique ou d'une erreur orthographique involontaire. Quand la différence entre deux noms génériques porte sur la terminaison, ces noms doivent être regardés comme distincts, même si la différence n'est qu'une lettre. Ceci ne doit pas être considéré comme une variante orthographique du même nom.

EXEMPLE : *Streptococcus erysipelatos* et *S. erysipelatis* sont de simples variantes orthographiques du même nom. *Erysipelatos*

est la traduction littérale du génitif grec, tandis qu'*crysipelatis* est la forme la plus usuelle et la traduction préférable de la forme latine.

(Voir principes 1, 4, 9 ; règles 5, 6, (c) ; recommandation 5 a.)

NOTE 1. — Les mots « appellation originale » dans cet article signifient l'appellation employée quand le nom a été publié légalement.

(Voir règles 1 et 2.)

NOTE 2. — L'emploi d'une voyelle erronée (ou l'omission d'une voyelle) dans une épithète spécifique, ou dans le nom d'un genre, est traité comme une faute d'orthographe involontaire et doit être corrigée.

NOTE 3. — Deux ou plusieurs noms ne différant que légèrement ne seront tenus pour distincts que s'ils ne peuvent pas être confondus. S'il y a un risque sérieux de confusion, ils doivent être traités comme des variantes orthographiques. Les cas douteux peuvent être soumis, pour avis, à la Commission judiciaire.

NOTE 4. — Les épithètes spécifiques ou autres et les noms d'origine grecque différant seulement par leur terminaison grecque ou latine sont des variantes orthographiques. Des épithètes ayant la même signification et différant seulement légèrement de formes sont considérées comme des variantes orthographiques. Les formes génitives et adjectives d'un nom personnel sont, toutefois, traitées comme des épithètes différentes.

EXEMPLE : *Hormodendron* et *Hormodendrum* ; la traduction littérale du neutre grec est *on*. La traduction usuelle préférable du latin est *um*. La liberté de corriger un nom doit être utilisée avec réserve, surtout si le changement affecte la première syllabe et avant tout la première lettre du nom.

RECOMMANDATION 27 a. — Quand un nouveau nom dérivant du grec contient la « *spiritus asper* » (esprit rude) celle-ci doit être transcrite par la lettre *h*.

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 b. — Il est conseillé d'utiliser pour les noms scientifiques un autre caractère fondamental que celui qui est employé pour le reste du texte, ou bien d'espacer les lettres, ou encore d'utiliser quelque autre système approprié.

EXEMPLE : « La maladie charbonneuse est causée par *Bacillus anthracis* Koch. » La typographie des noms scientifiques doit être soulignée.

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 c. — Quand un nouveau nom générique ou sous-générique est formé à partir d'un nom propre de personne il doit être formé de la façon suivante :

1° Quand le nom de la personne se termine par une voyelle on ajoute la lettre *a* (*Gaffkya* de Gaffky ; *Noguchia* de Noguchi ; *Serratia* de Serrati) sauf quand le nom se termine par *a*, auquel cas on ajoute *ea* (*Collaea* de Colla).

2° Quand le nom d'une personne se termine par une consonne on ajoute les lettres *ia* (*Escherichia* de Escherich ; *Erwinia* de Erwin F. Smith ; *Pasteuria* de Pasteur) sauf quand le nom se termine par *er*, auquel cas on ajoute *a* seulement ; (*Kerneria* de Kerner).

3° Les noms peuvent être formés par usage d'un préfixe ou d'un suffixe, ou modifiés par anagramme ou abréviation. Dans ces cas, ils comptent comme mots différents du nom original.

Dans beaucoup de cas, les noms de genre bactériens sont formés de noms de personnes par addition d'une terminaison diminutive. La convention la plus commune du latin moderne est la terminaison *-ellus*, *a*, *um*, de préférence : *-ella* en conformité avec la recommandation 5 a. Dans quelques cas l'une des terminaisons *illus*, *a*, *um*, a été ajoutée.

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

4° Les syllabes qui ne sont pas modifiées par cette terminaison conservent leur appellation originelle, même avec les consonnes *k* et *w* ou avec les groupements de voyelles qui ne sont pas employées dans le latin classique. Les lettres étrangères au latin botanique doivent être traduites et les signes diacritiques supprimés. Les diphtongues germaniques *ä*, *ö*, *ü*, deviennent *ae*, *oe*, *ue*. Les *é*, *è*, *ê* français deviennent *e* ; s'il est fait usage d'une langue dans laquelle les diphtongues ne sont pas représentées par un caractère spécial, le tréma doit être utilisé : *Aërobacillus* (non *Aerobacillus*).

RECOMMANDATION 27 d. — Une épithète d'espèce ou de sous-espèce nouvelle formée à partir d'un nom propre d'homme doit prendre la forme substantive ou adjective. Les syllabes qui ne sont pas modifiées par ces terminaisons conservent leur appellation originelle, même avec les consonnes *k* ou *w* ou avec le groupe de voyelles non utilisées en latin classique. Les lettres étrangères au latin botanique doivent être traduites et les signes diacritiques supprimés. Les lettres germaniques *ä*, *ö*, *ü* deviennent *ae*, *oe*, *ue* ; les *é*, *è*, *ê* français deviennent *e*.

Quand l'épithète est un substantif, il est formé de la manière suivante :

1° Quand le nom de personne se termine par une voyelle la lettre *i* est ajoutée (*sonnei*, de Sonne), excepté quand le nom

se termine par a, dans ce cas on ajoute un e (*balansae* de Balansa).

2° Quand le nom se termine par une consonne, les lettres ii sont ajoutées (*welchii*, de Welch) excepté quand le nom se termine en -er, cas où on ajoute simplement i (*barkeri*, de Barker).

Quand l'épithète est un adjectif il est formé par l'addition d'une terminaison appropriée (*pasteurianus*, a, um, de Pasteur).

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 c. — Les mêmes dispositions s'appliquent aux épithètes formées à partir de noms de femmes. Quand ceux-ci prennent la forme substantive on leur donne une terminaison féminine (*Cytophaga krzemieniewskae*).

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 f. — Les épithètes de nouvelles espèces doivent être écrites en conformité avec l'orthographe originale des mots à partir desquels elles sont formées et en accord avec les règles du Latin et de la latinisation.

EXEMPLE : *silvestris* (et non *sylvestris*) ; *sinensis* (et non *shinensis*).

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 g. — Les épithètes spécifiques, même quand elles dérivent de noms propres, ne doivent pas commencer par une majuscule.

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 h. — Dans la formation de noms ou d'épithètes composés de deux ou plusieurs racines prises dans le latin ou le grec, la voyelle placée entre les deux racines devient une voyelle de liaison, habituellement i pour le latin et o pour le grec. Quand la deuxième racine commence par une voyelle et demande un arrangement euphonique, la voyelle de liaison peut être éliminée. (EXEMPLE : *lepidantha*.) La voyelle de liaison æ ne doit être conservée que pour des raisons étymologiques (*caricæformis* de *carica*, dans le but d'éviter la confusion avec *cariciformis* de *carex*). Dans certains composés de mots grecs, les voyelles de liaison ne sont pas utiles : EXEMPLE : *brachycarpus* et *glycyphyllus*.

(Voir principes 1, 4 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

RECOMMANDATION 27 i. — Les auteurs doivent donner l'étymologie des noms génériques nouveaux et des épithètes nouvelles quand leur signification n'est pas évidente.

(Voir principes 1, 4 ; règle 5 ; recommandation 5 a ; règle 6 c.)

Règle 28.

Le genre des noms génériques est gouverné par les règles suivantes :

1° Un mot grec ou latin adopté comme nom générique conserve son genre classique. Dans le cas où le genre classique est variable, l'auteur a le droit de choisir. Dans les cas douteux, l'usage courant devra être suivi.

2° Les noms génériques formés de composés modernes de deux ou plusieurs mots grecs ou latins prennent le genre du dernier. Si la terminaison est modifiée, le genre la suivra.

EXEMPLE : *Spirochæte* est féminin parce que le nom grec *chæte* est féminin. Toutefois, si le nom *Spirochætum* était proposé, il devrait être neutre.

3° Les noms génériques arbitrairement formés et les noms vulgaires employés comme noms génériques prennent le genre que leur ont assigné leurs auteurs. Quand l'auteur original n'a pas indiqué le genre, la décision appartient à l'auteur suivant.

(Voir principes 4 ; règle 5.)

CHAPITRE IV

Conduite à tenir

dans les exceptions aux règles et pour l'interprétation.

Modification des règles.

DÉCISION 1.

Modification et amendement des règles.

Les règles ne peuvent être modifiées ou amendées que par un acte de la session plénière d'un Congrès international de Microbiologie organisé par l'Association Internationale des Microbiologistes.

DÉCISION 2.

Liste de *nomina conservanda*.

Pour éviter des modifications fâcheuses dans la nomenclature des genres qui pourraient survenir en raison de l'application stricte des règles, il est proposé une liste de noms qui peuvent être conservés à titre exceptionnel (*nomina conservanda*).

NOTE 1. — Cette liste de noms à conserver restera ouverte en permanence en vue d'additions nouvelles. Chaque proposition d'addition de nom doit être accompagnée d'un état détaillé des arguments pour et contre la conservation. Ces propositions doivent être soumises à la Commission judiciaire.

(Voir proposition 4 pour étude et décision.)

NOTE 2. — Quand un nom proposé pour être conservé a été provisoirement approuvé par la Commission judiciaire, les bactériologistes sont autorisés à en maintenir l'usage jusqu'à la décision du prochain Congrès international de Microbiologie.

NOTE 3. — Un « nom conservé » l'est envers et contre tout autre nom pour le groupe, qu'il soit cité ou non dans la liste correspondante de noms rejetés, et aussi longtemps que le groupe qu'il conserve n'est pas réuni à cet autre groupe portant un nom *légitime*. Dans le cas où deux groupes sont réunis, le premier des deux noms en compétition est adopté en raison de l'application des règles 19, 20, 21.

NOTE 4. — Un nom « conservé » l'est envers et contre tout homonyme antérieur.

EXEMPLE : Le nom générique *Bacillus* Cohn avec comme espèce-type *subtilis* Cohn em. Prazmowski est conservé par recommandation du Comité de Nomenclature et la décision du II^e Congrès international de Microbiologie.

(Voir principes 6, 9 ; règles 24 (5), (6), (7).)

DÉCISION 3.

Liste de *Nomina rejicienda*.

Pour éviter une confusion inutile dans la nomenclature des bactéries par l'application stricte des règles, on préconise une liste de noms (*nomina rejicienda*) qui ne sont pas utilisables, c'est-à-dire doivent être définitivement rejetés. Cette liste comprend : 1° des noms qui, par suite de ségrégation, sont employés avec des sens différents et ont été une source permanente de confusions et d'erreurs (*nomina ambigua*) ; 2° des noms dont l'application est douteuse (*nomina dubia*), et 3° des noms appliqués à un groupe composé de deux ou plusieurs éléments discordants, spécialement si ces éléments sont supposés à tort faire partie du même individu (*nomina confusa*).

(Voir principes 6, 9 ; règles 24 (5), (6), (7).)

NOTE 1. — Cette liste de noms rejetés demeurera ouverte en permanence pour additions. Toute proposition de noms à rejeter doit être accompagnée par un état détaillé des arguments pour et contre son rejet. Toute proposition doit être soumise à la Commission judiciaire du Comité international de Nomenclature pour étude et décision. Quand un nom proposé pour être rejeté a été rejeté provisoirement par la Commission judiciaire, les bactériologistes sont autorisés à le rejeter jusqu'à la décision du prochain Congrès international de Microbiologie.

NOTE 2. — Un nom rejeté ne peut être réintroduit ultérieurement dans la littérature bactériologique, exception faite pour les *nomina dubia* qui peuvent être supprimés de cette liste à la suite de la reconnaissance de leur légitimité par la Commission judiciaire de Nomenclature.

DÉCISION 4.

CONSTITUTION DU COMITÉ DE NOMENCLATURE.

Un Comité permanent de Nomenclature a été constitué par l'Association internationale des Microbiologistes au cours de leur Congrès. Ce Comité de Nomenclature est constitué de telle sorte que chaque nation y est représentée par un membre au moins et cinq au plus. La nomination des membres est faite sur la recommandation des sociétés de Microbiologie ou par les membres des Congrès internationaux. Ces recommandations doivent être faites à l'un des secrétaires permanents qui les transmet au Comité de Nomenclature pour être examinées au congrès suivant. Les nominations sont faites après proposition du Comité de Nomenclature par un vote de la session plénière du Congrès international. Ce Congrès élit deux secrétaires permanents, l'un représentant la bactériologie médicale et l'autre la bactériologie extra-médicale. Le Comité de Nomenclature peut élire tout autre titulaire de toute fonction. Une liste complète des membres du Comité de Nomenclature sera publiée dans les comptes rendus de chaque Congrès triennal international de Microbiologie. Le Comité de Nomenclature sélectionne parmi ses membres, à l'exception toutefois de ceux qu'il a recrutés par cooptation, une Commission judiciaire comprenant douze membres. Elle élit un Président. Les deux secrétaires permanents du Comité de Nomenclature sont membres de droit de la Commission judiciaire. Les membres de la Commission, nommés en principe pour neuf ans, sont répartis en trois groupes de quatre membres. Chacun des groupes de quatre membres se retire au cours d'un des Congrès internationaux.

En cas de résignation des fonctions ou de décès d'un des membres, le Comité international désigne à sa réunion la plus proche un remplaçant intermédiaire.

a) *Le Comité de Nomenclature a les fonctions suivantes :*

1° Etudier les propositions et prendre des décisions relatives à la rédaction et aux modifications des règles de la nomenclature, en particulier des règles relatives aux bactéries, et aussi aux autres groupes quand ceci est souhaitable. Le Comité proposera telle action qui peut être soumise à la session plénière du Congrès international suivant.

2° Etudier toute proposition ou avis de la Commission judiciaire. Les propositions demeurent définitives si elles ne sont pas rejetées par le Congrès international suivant.

3° Désigner les collections officielles de cultures-types.

4° Recevoir les rapports et propositions de la Commission judiciaire et statuer à leur sujet, ainsi que sur les propositions d'autres comités s'occupant des problèmes de nomenclature et de taxonomie.

5° Tenir au moins une session triennale en liaison avec les Congrès Internationaux de Microbiologie.

6° Communiquer à la session plénière de chaque Congrès un rapport sur ses travaux, et proposer ses décisions à l'approbation du Congrès.

7° Coopérer avec les autres comités similaires, en particulier ceux des Congrès internationaux de Botanique et de Zoologie, afin d'envisager avec eux les problèmes communs de nomenclature.

(Voir Considération générale 1.)

b) *La Commission judiciaire du Comité de Nomenclature microbiologique a les fonctions suivantes :*

1° Formuler des « avis » quand elle est sollicitée au sujet de l'interprétation des règles de nomenclature dans les cas où l'application des règles donne lieu à des difficultés d'interprétation.

2° Préparer des « avis » relatifs aux statuts des noms qui ont été proposés, introduisant, quand cela semble nécessaire, les noms en cause dans telle ou telle liste :

Nomina rejicienda, Nomina conservanda, etc.

3° Rédiger les propositions en vue des amendements aux règles de la nomenclature bactériologique internationale pour les présenter au Comité international.

4° Préparer les « avis » relatifs aux types, en particulier aux types d'espèces et de genres et établir une liste des genres bactériens propres avec l'espèce-type de chacun d'eux.

5° Préparer et publier une liste des noms de genres qui ont été proposés pour les bactéries et protozoaires ou pour d'autres groupes auxquels s'intéressent les microbiologistes, dans le but d'aider les auteurs de noms nouveaux à éviter les homonymes illégitimes.

6° Elaborer une liste de publications microbiologiques dans lesquelles les noms de microbes ne seront pas considérés comme publiés valablement.

7° Rédiger et publier les règles internationales de la nomenclature bactériologique, des avis, des listes de *Nomina conservanda*, de *Nomina rejicienda*, d'espèce-type, etc.

8° Communiquer au Comité international au cours de ses réunions triennales ses recommandations, propositions et avis.

9° Communiquer au Comité international les noms des membres dont la fonction arrive à son terme, ainsi que la liste des vacances causées par résignation de fonctions ou décès.

10° Préparer des « avis » quand il y a sollicitation relative aux statuts de nomenclature des micro-organismes autres que bactéries et virus étudiés par les techniques microbiologiques, par exemple : les levures, les champignons et les protozoaires. Toutefois, ces avis ne doivent pas être publiés tant que les commissions chargées de l'interprétation des codes de nomenclature botanique et zoologique ne les auront pas confirmés.

RECOMMANDATION 4. — Lorsqu'un microbiologiste considère que l'application d'une règle ou d'une recommandation prête à confusion, il lui est conseillé de préparer un résumé de la question comprenant les références qui s'y rapportent, et un exposé des arguments pour ou contre les diverses interprétations. Ce résumé doit être soumis au président de la Commission judiciaire par l'intermédiaire d'un des secrétaires permanents. Un avis sera formulé, qui ne sera publié que s'il est approuvé par huit membres au moins de la Commission.

(Voir principes 2, 6.)

RECHERCHES SUR LA GÉLIFICATION DES PROTÉINES

II. — ACTION DE LA TEMPÉRATURE SUR LA GÉLIFICATION PAR LES BASES ET LES ACIDES MINÉRAUX FORTS

par Em. BARBU et M. MACHEBOEUF (*).

Nous avons déjà présenté (1) quelques faits sur la gélification des solutions de protéines par les bases et les acides minéraux forts à la température de 20° C. Les faits observés sont fortement influencés par la température qui agit sur la vitesse d'évolution de divers phénomènes et sur l'état final.

Nous n'étudierons pas en détail aujourd'hui la vitesse. Nous tracerons les diagrammes correspondant aux états finals indépendamment de la vitesse avec laquelle on parvient à ces états.

Nous avons dit que, à 20° C, une solution de pseudoglobulines de sérum de cheval (débarrassée des électrolytes par dialyse), à condition que la concentration protéique dépasse le seuil de 6 p. 100, se transforme en un gel ferme et limpide lorsque la quantité de soude présente atteint un certain taux ($\text{pH} > 11,5$). Si la concentration en soude est trop forte ($\text{pH} > 12$), le gel ne persiste pas longtemps mais se liquéfie. Nous avons dit en outre que la gélification était également obtenue en milieu acide (HCl ou SO_4H_2), lorsque le pH atteignait une valeur qui dépend de la concentration en globulines (pH 3,5 par exemple pour une concentration de 11 p. 100 de pseudoglobulines et pH 2 pour 7 p. 100). Si l'acidité est trop forte, le gel est opalescent, voire opaque, mais c'est seulement lorsque la concentration en acide est considérable (2M environ), que le gel est remplacé par un coagulum laissant exsuder un liquide (synérèse) ou bien par un précipité, si l'acidité est encore plus forte.

L'albumine du sérum de cheval (purifiée par cristallisation, puis par dialyse), diffère des globulines en ce qu'elle ne gélifie jamais par acidification à 20° C même pour des concentrations considérables ($> 2\text{M}$) en un acide fort tel que HCl ou SO_4H_2 . Cependant les solutions très riches en acide ($> 2\text{M}$) ne sont pas stables ; il se forme lentement en leur sein un précipité.

En milieu alcalin, au contraire, l'albumine se comporte à 20° C.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 mars 1948.

(1) Em. BARBU et M. MACHEBOEUF, *C. R. Soc. Biol.*, 14 février 1948 (sous presse).

à peu près comme les globulines ; tout au plus doit-on noter que la zone de stabilité du gel est légèrement plus grande. Signalons enfin que la concentration liminaire au-dessous de laquelle la gélification alcaline est impossible est un peu plus basse (4, 5 p. 100) que pour les globulines (6 p. 100).

*
* *

Les diagrammes que nous avons tracés en étudiant les changements d'état de nos solutions protéiques en fonction du pH et de la température, varient considérablement avec la concentration protéique et diffèrent avec la nature des protéines. Le phénomène est très complexe. Etudions donc d'abord un cas particulier, celui d'une solution de *pseudoglobulines de sérum de cheval* à la concentration constante de 9,5 p. 100 et à pression voisine de la pression atmosphérique. Les seules variables étaient : 1° la température et 2° la quantité de soude ou d'acide contenue dans la solution.

Nous avons vérifié que deux acides HCl et SO_4H_2 donnaient, à normalités égales, des résultats pratiquement égaux. Nous avons donc, dans nos diagrammes, porté les pH en abscisses (et opéré tout le temps avec HCl).

Les faits principaux observés pour ces pseudoglobulines sont les suivants :

1° Les gels limpides et stables obtenus à la température ordinaire en milieu alcalin ou en milieu acide se liquéfient lorsque l'on élève suffisamment la température et se reforment si l'on refroidit. Il n'y a pas réversibilité intégrale, surtout en milieu alcalin, car après chaque fusion par chauffage, on observe que la température à laquelle le gel se refait diminue légèrement ainsi que la température à laquelle il faut chauffer à nouveau pour obtenir la liquéfaction.

En observant de tels gels qui se liquéfient à chaud et se reforment à froid, on croirait avoir affaire à des gels de gélatine.

2° Pour une certaine zone de pH entre 8 et 11,5 dans le cas présent, le mélange est liquide à la température ordinaire, mais il se gélifie si l'on chauffe suffisamment (la température de gélification est fonction du pH). Le gel ne se liquéfie pas par refroidissement.

3° Dans cette même zone de pH, si l'on ne chauffe pas tout à fait assez pour gélifier, puis si l'on refroidit, le liquide devient un gel stable à la température ordinaire, mais se liquéfie à nouveau par chauffage. On a donc ainsi transformé un liquide en un gel réversible G. R., tandis que si l'on avait chauffé plus fort, on aurait obtenu un gel plus stable G. S. qui ne passerait pas à l'état liquide par le chauffage modéré qui suffit à liquéfier G. R.

Les faits sont très nets : opérons par exemple à pH 8,5 (la

concentration en globulines étant exactement 9,5 p. 100), plaçons le liquide dans une ampoule scellée et plongeons-la dans un bain-marie à 82° C, laissons-la une dizaine de minutes; on ne remarque aucune modification d'aspect, mais si l'on refroidit, le mélange devient rapidement un gel limpide et très ferme qui persisterait indéfiniment à la température ordinaire. Chauffons à nouveau l'ampoule à 82° C; il y a liquéfaction et l'on pourrait répéter de nombreuses fois la gélification, puis la fusion du gel. Mais si l'on fait une expérience semblable en élevant la température jusqu'à 95° C, le liquide se prend en un gel ferme qui reste stable même si l'on chauffe à 100° pendant longtemps et qui ne se liquéfie pas par refroidissement.

Il y a donc dans cette zone de pII deux transformations distinctes par le chauffage : 1° une transformation de la protéine soluble en une protéine qui gélifie réversiblement par refroidissement; 2° une transformation par chauffage un peu plus fort, en une protéine qui forme un gel stable de 0 à 100° C.

3° Lorsque l'on opère à un pII peu éloigné de l'isoélectrique de la protéine, on obtient seulement des gels opaques ou des coagulums.

4° En milieu acide, on peut obtenir des gels limpides en chauffant vers 60 ou 65° C des solutions qui n'étaient pas assez acides pour gélifier à la température ordinaire (entre pH 3 et 4,2 pour la solution de globulines à 9,5 p. 100). Mais on ne constate pas le passage par un état intermédiaire préalable dans lequel la protéine est modifiée et gélifiée par refroidissement. Le passage est plus brusque entre la zone de liquide et la zone de gel.

Le diagramme n° 1 ci-contre a été tracé en notant les changements d'état d'une nombreuse série de mélanges dans lesquels la concentration en globulines était 9,5 p. 100. Il s'agissait des pseudoglobulines totales de sérum de cheval séparées des albumines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, puis débarrassées des sels et des euglobulines par dialyse. (Pendant la dialyse, on maintenait une contre-pression afin de concentrer la solution par exosmose.)

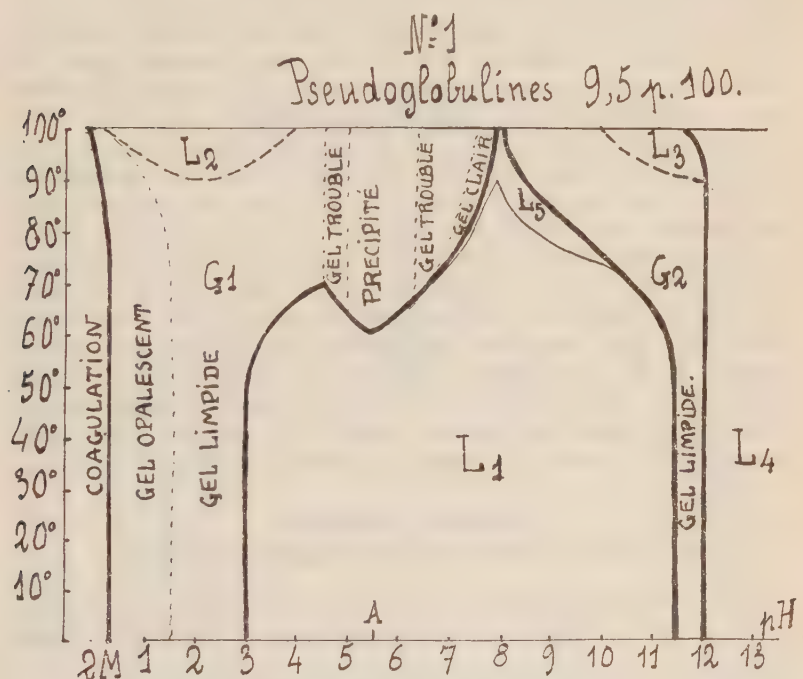
Les lignes en traits gras limitent les zones lorsque le passage d'une zone à l'autre correspond à un changement d'état irréversible.

Les lignes en traits interrompus (-----) limitent les zones lorsque le changement d'état est réversible. Les lignes en trait fin (-----) délimitent la zone particulière dans laquelle le liquide devient gélifiable réversiblement par refroidissement. Enfin, les lignes pointillées délimitent les zones entre lesquelles le passage est progressif, donc mal délimité. Il n'y a pas, à proprement parler, dans ce cas, un changement d'état, mais un simple changement d'aspect.

Le point A sur l'axe des abscisses correspond au pH isoélectrique moyen des protéines étudiées.

Nous limitons l'axe des abscisses à pH 1 et à pH 13, mais nous indiquons par 2M le point correspondant à une concentration bimoléculaire en acide.

Il est bien évident que le tracé de toutes les courbes de ce diagramme n'est pas absolument rigoureux, car le passage d'un état à l'autre est parfois lent et le résultat observé dépend de la durée



du chauffage à la température considérée. Afin d'éliminer ce facteur dans notre tracé, nous avons noté toujours la température pour laquelle le changement d'état était terminé avant dix minutes.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Un volume, toujours le même, d'une solution très concentrée de protéine était mélangé à la température ordinaire avec un volume constant d'une solution de soude ou d'acide chlorhydrique de concentration convenable pour que le mélange ait le pH souhaité. Dans chaque cas, on vérifiait ce pH par l'électrode à hydrogène. La concentration finale en protéines était ainsi cons-

tante, 2,3 ml. de chaque solution étaient placés dans une ampoule de verre de 3 ml. que l'on scellait à la flamme. Une série d'ampoules ainsi préparées étaient toutes placées en même temps dans un bain-marie dont la température était 50° C, car nous avions préalablement noté que, jusqu'à cette température, il ne se produisait aucun phénomène différent de ceux observés à la température ordinaire (si ce n'est dans la vitesse de formation des gels; or nous n'envisageons pas aujourd'hui la vitesse). Les ampoules étaient laissées dix minutes à cette température, puis on les sortait toutes pour observer l'état de leur contenu. On plongeait ensuite ces ampoules dans de la glace fondante pour les observer à nouveau après refroidissement. Les ampoules étaient alors replacées dans le bain-marie à 50° C pour leur faire reprendre cette température. On les y laisse deux minutes, puis on les plonge dans un autre bain-marie dont la température est 55° C. On les laisse là dix minutes, puis on les sort pour les observer et refroidir à nouveau. On opère ainsi de proche en proche par une série de bains-marie dont les températures s'échelonnent de 5 en 5° jusqu'à 100° C (2). Et c'est la même série de 21 ampoules qui est ainsi chauffée à 10 températures différentes. Des ampoules analogues sont conservées comme témoins à la température ordinaire ou à d'autres températures (0° et 40° C). Enfin des séries d'ampoules dont les pH étaient très proches les uns des autres ont permis, à des essais ultérieurs, de préciser les points importants des diagrammes.

*Quelques conclusions
tirées de l'observation du diagramme n° 1.*

Cinq zones correspondent à un état liquide : L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 :

1° La zone L_1 correspond à des liquides qui n'ont jamais changé d'état.

2° Les zones L_2 et L_3 correspondent à des liquides obtenus par liquéfaction réversible de gels.

3° La zone L_4 correspond à des liquides qui ont été des gels mais se sont liquéfiés secondairement. Ici la quantité de soude est trop forte pour que le gel soit stable. La soude détruit à la longue le gel, probablement par un phénomène d'hydrolyse.

4° La zone L_5 est très particulière. Les mélanges y sont liquides,

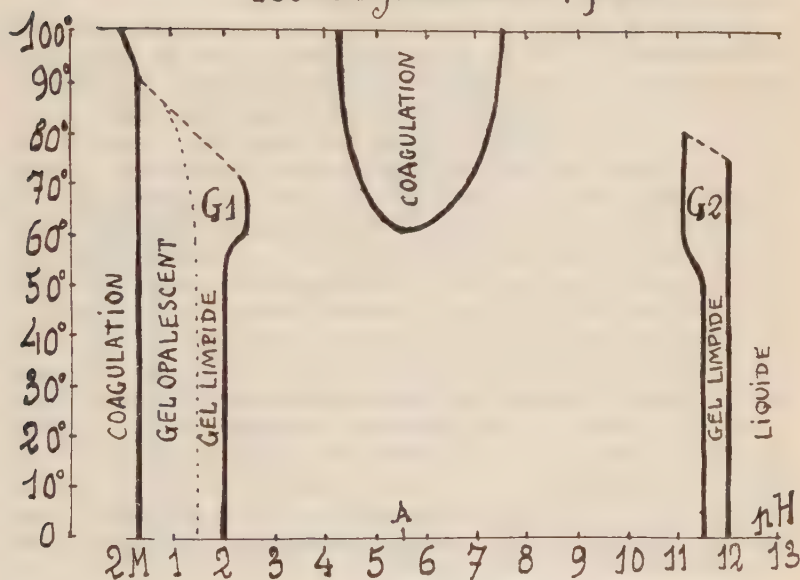
(2) Etant donné ce mode opératoire, les points expérimentaux sont déterminés avec une erreur possible de l'ordre de 5° C. Nous n'avons pas cherché une précision plus grande. Notons par exemple que les minimas de la courbe limitant la coagulation isoélectrique des globulines sont sur tous nos diagrammes placés à 60°. Or leur position varie légèrement avec la concentration protéique.

mais leurs protéines sont modifiées et si l'on refroidit (si par conséquent on revient dans la zone L_1), il y a gélification réversible.

En opérant vers pH 9 avec précaution, en rentrant dans la zone L_5 , puis en refroidissant, on obtient un gel dont le chauffage progressif conduira à une observation très curieuse. En effet, ce gel (stable à la température ordinaire), se liquéfiera vers 75° (liquéfaction réversible), puis redeviendra un gel vers 85° . Mais le gel définitif ainsi formé ne se liquéfiera plus en repassant, par refroidi-

N°2

Pseudoglobulines 7p.100.



dissement dans la zone L_5 . Le passage de L_5 à la zone G_2 est irréversible.

On est obligé d'admettre des modifications définitives de la protéine lorsqu'elle passe de la zone L_1 à la zone L_5 , puis de la zone L_5 à la zone G_2 . La gélification des protéines par les acides ou par les alcalis, n'est pas un simple changement d'état, mais s'accompagne d'une modification intime de la protéine. De même, la liquéfaction d'un gel par un excès d'alcali est un phénomène irréversible.

Par contre, la liquéfaction d'un gel par chauffage peut être réversible même pour des protéines autres que les gélatines. En effet, les passages de G_1 à L_2 et de G_2 à L_3 sont réversibles. De

même le gel obtenu par refroidissement d'un mélange porté dans la zone L_3 , peut être réversiblement liquéfié par chauffage (tant que ce chauffage n'est pas assez fort pour que soit atteinte la zone G_2).

Pour généraliser ces conclusions nous avons étudié d'autres concentrations en globulines.

Le diagramme n° 2 correspond à la concentration de 7 p. 100 en pseudoglobulines de cheval :

Nous retrouvons ici encore une zone de gélification en milieu alcalin puisque nous sommes au-dessus de la concentration liminaire qui, pour ces globulines, est 6 p. 100. Mais cette zone a une surface faible et elle est nettement séparée d'une zone de coagulation voisine du pH isoélectrique moyen.

De même, la zone de gélification acide est moins vaste que pour le diagramme n° 1 et elle ne rejoint plus la zone de coagulation isoélectrique. Par contre, les zones de liquéfaction L_2 et L_3 du diagramme n° 1 sont devenues considérablement plus vastes et ont rejoint la zone L_1 , mais la liquéfaction réversible s'observe toujours aux limites de ces zones et des zones de gélification G_1 et G_2 . En somme, de pH 7, jusqu'à pH 11, pour une concentration en globulines de 7 p. 100, il n'y a plus jamais gélification par chauffage. De même, entre pH 2,5 et 4,3. Il y a continuité apparente entre les zones L_1 et L_3 . Mais il doit cependant exister une limite entre ces zones. On n'aperçoit plus cette limite, car la concentration protéique est trop faible pour que la gélification s'opère, mais les protéines doivent être modifiées et des études sur leurs propriétés physicochimiques devraient révéler ces modifications. Nous avons en somme ici un phénomène analogue à celui dit de Sørensen. (Lorsque l'on chauffe une solution protéique très pauvre en électrolytes il n'y a pas coagulation, mais la protéine est modifiée car, si après refroidissement on ajoute des sels, la coagulation apparaît). Mais nous n'envisageons pas aujourd'hui l'action des sels.

Le diagramme n° 3 correspond à la concentration de 4 p. 100 en pseudoglobulines de cheval.

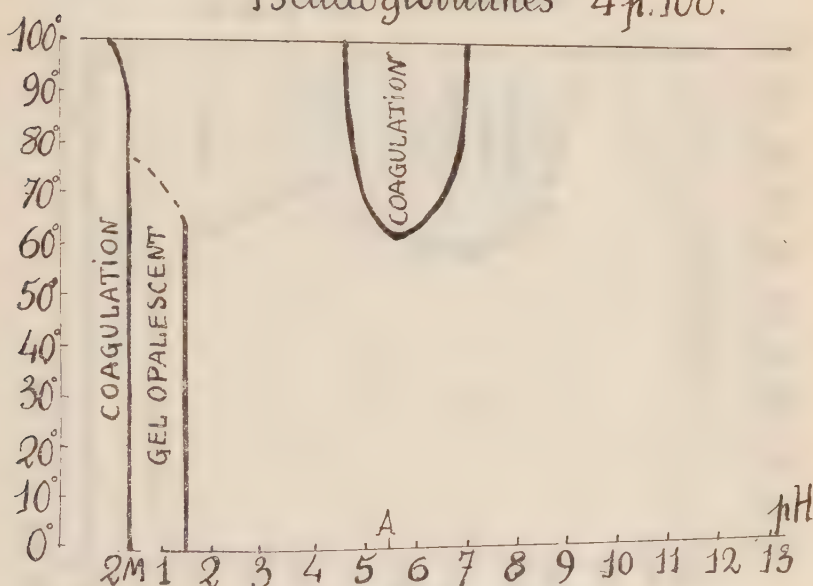
Ici, la concentration est inférieure à 6 p. 100 que nous savons être la concentration liminaire pour la gélification des globulines par les alcalis. Le diagramme ne comporte donc plus de zone G_2 (au fur et à mesure de la diminution de la concentration, cette zone a diminué de surface. Elle a maintenant disparu). Les zones L_1 , L_3 et L_4 se sont réunies.

Il est bien probable que les protéines subissent cependant des modifications lorsqu'elles passent de l'une à l'autre de ces zones, mais ces modifications passent inaperçues, lorsque l'on se contente du simple critère de la gélification. La zone de coagulation isoélectrique s'est également rétrécie, mais elle persiste.

La surface de la zone de gélification acide a également diminué ; les gels n'apparaissent plus qu'en milieu très acide (pH 1,5), ils deviennent donc rapidement opalescents ; la zone de gel limpide stable a disparu. Notons toutefois que la liquéfaction réversible par chauffage (limite entre zones G_1 et L_2) est encore perceptible et l'on doit noter que lorsque le gel opalescent se liquéfie par chauffage, on obtient une solution limpide qui redonne par

N° 3

Pseudoglobulines 4 p.100.



refroidissement un gel limpide qui ne devient opalescent qu'après un certain temps (comme lorsque s'était effectuée la première gélification).

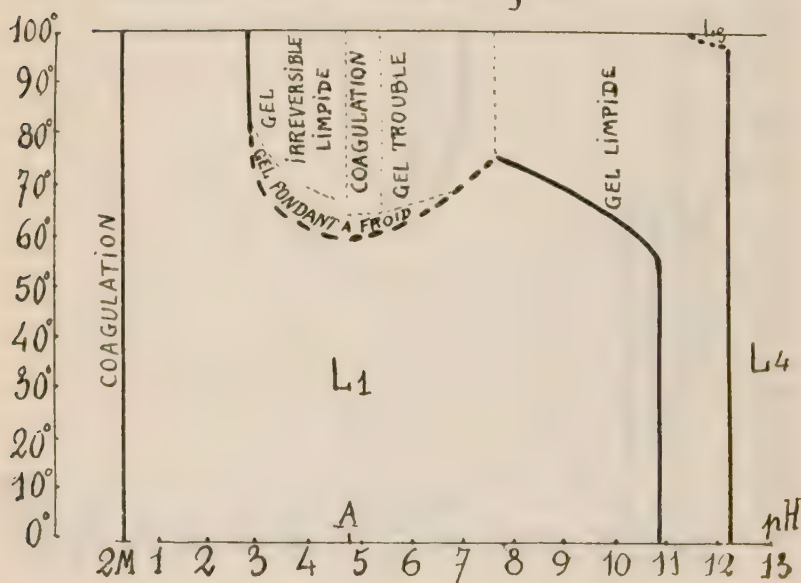
En somme, pour se rendre parfaitement compte de l'ensemble des phénomènes observés, il faudrait tracer un diagramme à trois dimensions dont les axes de coordonnées porteraient l'un le pH, l'autre la température et le troisième la concentration en globulines. Les trois diagrammes que nous reproduisons ici (1, 2 et 3) sont des coupes du diagramme à trois dimensions, coupes effectuées perpendiculairement à l'axe des concentrations en globulines.

CAS DE L'ALBUMINE CRISTALLISÉE DU SÉRUM DE CHEVAL.

Ici la gélification proprement dite n'a jamais lieu par simple acidification, même si la proportion d'acide est considérable. En somme, la zone G_1 des diagrammes des globulines n'existe pas, mais la partie alcaline des diagrammes rappelle beaucoup celle des diagrammes de globulines. On retrouve les zones L_1 , G_2 , L_3

N° 4

Albumine 12 p. 100.



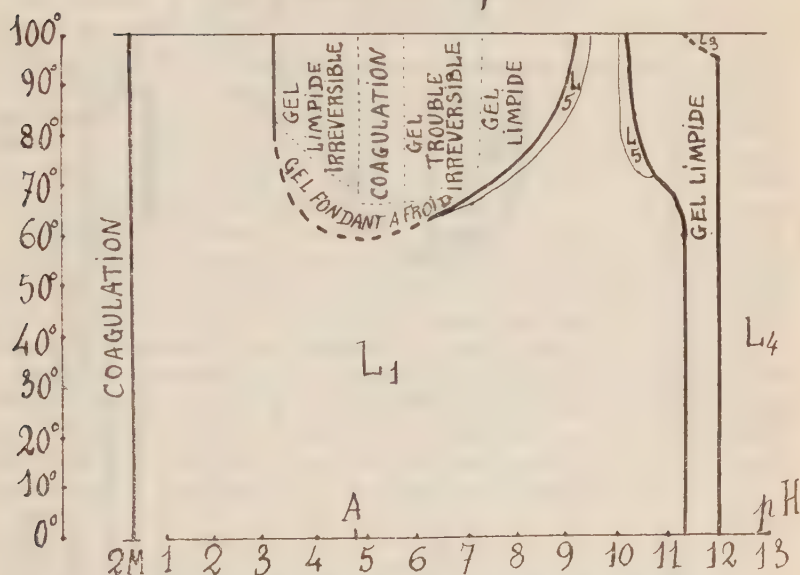
et L_3 , puis la zone isoelectrique dont le sommet est naturellement à pH 4,8 au lieu de 5,5 comme pour les globulines.

La zone isoelectrique présente un phénomène très particulier qui est la liquéfaction réversible par refroidissement. Voici un exemple typique de ce phénomène : une solution à 12 p. 100 de cristalbumine bien dialysée est amenée à pH 4,5 par une trace d'acide chlorhydrique. On chauffe progressivement en observant les changements d'état tous les 3 degrés. Vers 62°, on note que le liquide est devenu un gel limpide et bien ferme. Laissons refroidir à la température ordinaire, le gel semble, au début, persister, mais, après trois ou quatre heures, le mélange est redevenu liquide.

Cette liquéfaction est lente et progressive. Ces changements d'état sont réversibles, car si l'on chauffe à nouveau vers 62°, le gel se reforme. Nous avons pu ainsi faire passer de nombreuses fois le mélange à l'état de gel par chauffage, puis à l'état liquide par refroidissement (3). Notons qu'il ne faut pas dépasser très largement la température de gélification si l'on veut que la liquéfaction se fasse par refroidissement. En effet, si l'on chauffe au

N° 5

Albumine 9 p.100.



delà de 80° environ, le gel ne se liquéfiera plus à froid. Nous avons indiqué ceci sur les diagrammes par une ligne pointillée qui délimite approximativement la zone où le gel formé est irréversible. En somme, nous trouvons ici une nouvelle différence nette entre albumines et pseudoglobulines : les pseudoglobulines ne forment

(3) Ces phénomènes de gélification réversible peuvent être mis en évidence pour tous les pH correspondant à la zone isoélectrique de coagulation, mais c'est dans la partie acide de cette zone (pH entre 3 et 4,7) qu'ils sont le plus facilement observés, car les écarts sont plus grands entre les conditions de gélification réversible et les conditions de gélification irréversible.

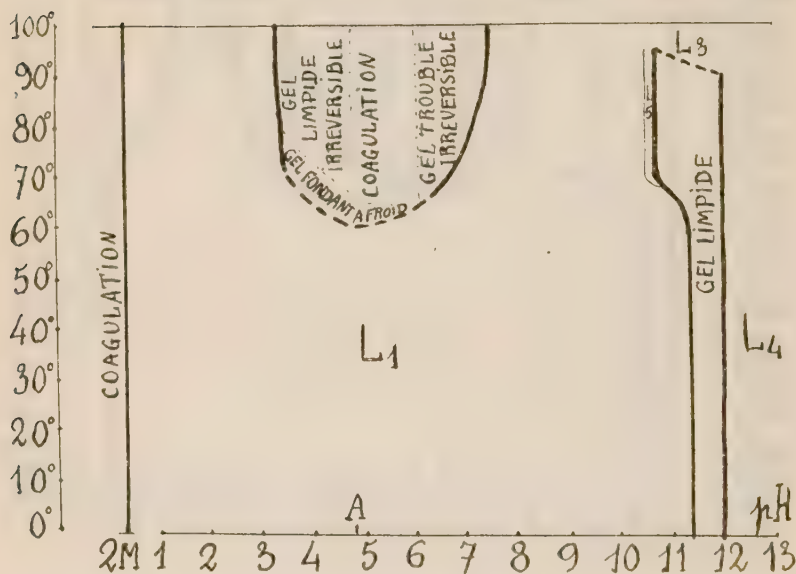
jamais de gel qui apparaisse par chauffage et disparaisse par refroidissement.

Dans le cas des albumines, il existe également une zone L_s dans laquelle les protéines sont transformées et deviennent capables de gélifier réversiblement par refroidissement, mais la mise en évidence de ce phénomène est plus difficile que pour les globulines, car la zone L_s est plus étroite.

En résumé, toutes les protéines du sérum de cheval que nous avons étudiées peuvent former des gels limpides dans certaines

N° 6.

Albumine 7 p. 100



conditions et il est possible d'obtenir des gels fondant à chaud pour réapparaître à froid comme le font les gels de gélatine. Mais ce phénomène de fusion réversible des gels est observable pour les protéines de sérum dans des zones de pH bien plus limitées que pour la gélatine.

Il faut distinguer deux phénomènes très différents :

1° La gélification isoelectrique qui se manifeste (avec souvent d'ailleurs une coagulation) dans le voisinage du pH isoelectrique et dont les gels ne fondent pas par chauffage.

2° La gélification proprement dite par les acides ou les bases qui

se produit dans des domaines de pH éloignés de l'isoelectrique et dont les gels fondent réversiblement par chauffage à une température qui est fonction du pH et aussi de la concentration protéique.

La gélification proprement dite n'est obtenue en milieu alcalin que lorsque la concentration protéique est au moins égale à une certaine concentration dite « liminaire » qui est fonction de la nature des protéines.

La gélification proprement dite en milieu acide est obtenue pour les globulines mais pas pour les albumines.

Lorsque les concentrations protéiques sont très élevées, les zones de gélification isoelectrique et de gélification proprement dite peuvent se rejoindre et empiéter les unes sur les autres.

En somme, la gélatine est une protéine chauffée qui ne se distingue pas aussi nettement qu'on le pensait d'avec d'autres protéines chauffées. Elle se distingue simplement par une étendue beaucoup plus grande des zones dans lesquelles elle donne des gels fusibles à chaud. Divers facteurs que nous n'avons pas étudiés dans le présent travail influent profondément sur les phénomènes de gélification : citons la teneur en électrolytes et la pression. Nous en poursuivons l'étude actuellement.

Notons enfin que les bases et les acides minéraux forts ne sont pas les seuls agents capables de gélifier les protéines. Nous espérons apporter bientôt une étude détaillée sur la gélification par les acides organiques (acides lactique et acétique), par les bases organiques (pyridine), par les cyanures et par les alcools.

Nous ne tenterons pas dès maintenant une interprétation des faits présentés aujourd'hui, nous voulons nous appuyer pour cela sur des recherches qui doivent faire l'objet de mémoires ultérieurs (études sur l'action des pressions très élevées sur la gélification et études sur la viscosité et la biréfringence d'écoulement).

CULTURE SUR MEMBRANES PLASTIQUES EN MILIEU LIQUIDE DE DIFFÉRENTS TISSUS (TISSU NERVEUX ET MÉSENCHYMATEUX)

par GEORGES BARSKI et JACQUES MAURIN (*).

(Institut Pasteur, Service des Virus, D^r P. LÉPINE.)

La culture prolongée de tissus en milieu liquide sans plasma, donc sur un support artificiel, a été tentée par de nombreux auteurs [Lewis et Lewis (1912); Drew (1924); Grossfeld (1934); Zakrzewski (1934) et d'autres]. Une telle méthode permettant l'introduction et l'élimination rapide d'agents chimiques et sérologiques dans la culture, la suppression des repiquages et une coloration directe et facile de la culture serait très souhaitable. Pour la culture des virus *in vitro*, elle constituerait un complément naturel de la méthode de Maitland de culture massive sur tissu survivant, qui ne permet pas l'étude histologique.

La mise au point d'une telle méthode serait possible à condition de trouver pour le tissu en croissance, un support qui puisse remplacer avantageusement le réseau de fibrine du caillot plasmatique.

Les seuls auteurs qui, à notre connaissance, aient pu obtenir une culture *prolongée* en milieu liquide sur verre, sont des Ligneris (1936) et récemment P. R. White (1946). Mais tous les deux soulignent que leurs résultats, bien qu'encourageants, n'étaient pas constants à cause de l'imperfection du support employé (verre et mica).

L'idée d'aborder de nouveau ce problème nous a été donnée par la tâche que nous nous sommes fixée de préparer des cultures de tissus infectées ou non par des virus sur un support suffisamment mince pour permettre leur examen au microscope électronique (Wirth, Atanasiu, Barski et M^{lle} Croissant, 1947).

Comme cela a déjà été décrit en détail (Wirth et Barski, 1947), nous avons pu constater qu'une très fine membrane de matière plastique (formvar) obtenue à la surface de l'eau et recueillie ensuite sur une lamelle mouillée est très favorable à une migration et croissance cellulaire et facile à manier. Après avoir obtenu le

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 mars 1948.

maintien d'une couche de milieu liquide à ménisque concave à l'aide d'anneaux de verre placés sur la membrane nous avons pu obtenir une croissance très rapide et régulière de tissu épithélial pur à partir de poumon embryonnaire. Cette croissance s'est montrée même plus abondante et plus uniforme que celle obtenue sur plasma. Elle est en même temps beaucoup plus importante que celle qu'on a pu observer directement sur verre sans membrane plastique.

Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier dans quelle mesure notre méthode de culture sur membranes plastiques en milieu liquide peut être :

a) Appliquée à la culture d'autres tissus (en particulier du tissu nerveux) ;

b) Considérée comme une culture vraie et poursuivie pendant un temps prolongé, et enfin,

c) Appliquée à l'étude de lésions provoquées par une infection à virus.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

1° MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Nous nous servons, pour les cultures, de tissu embryonnaire de poulets de dix à dix-neuf jours. Pour la culture du tissu épithélial, nous employons le poumon d'embryon de seize-dix-neuf jours, tandis que pour la culture des fibroblastes et du tissu nerveux, nous prélevons le cœur ou le cerveau d'un embryon plus jeune (dix-treize jours). Le tissu est découpé en très petits morceaux de $0,25 \text{ mm}^2$ approximativement, ce qui favorise la croissance dans les conditions de nos cultures et facilite ensuite après fixation et coloration, l'examen au fort grossissement. L'instrument utilisé pour découper le tissu doit être parfaitement tranchant et changé à chaque fois.

Les résultats publiés ici sont obtenus avec un milieu liquide composé d'un mélange de sérum, d'extrait embryonnaire et de liquide de Tyrode. Le milieu est préparé exactement de la façon que nous avons décrite dans notre précédent travail sur la culture du tissu épithélial. Le pH est seulement ajusté très exactement à la valeur de 7,2 — 7,4, par l'introduction de CO_2 . On peut conserver le milieu à la glacière (+ 4°C) pendant une semaine, mais le milieu fraîchement préparé est toujours plus actif.

La mise en culture se fait sur lamelles recouvertes d'une pellicule de matière plastique (formvar) placées sur des carrés de verre vaselinés comme cela a déjà été décrit en détail (Wirth, Barski, 1947). La seule remarque à ajouter concerne les anneaux de verre posés sur la membrane plastique et dont le principal rôle est de maintenir à leur intérieur une couche de liquide dont l'épaisseur est le résultat de l'interaction de la pesanteur et de la capillarité. Les dimensions de ces anneaux jouent un rôle de premier

plan dans la culture. L'influence de ce facteur se manifeste surtout dans la culture très délicate du tissu nerveux. Les dimensions optima sont de 10 mm. à l'intérieur de l'anneau pour une épaisseur de tige de 2 mm.

Les fragments peuvent être mis sur place aussi bien avant le milieu qu'après. Le renouvellement du milieu s'effectue au moins toutes les quarante-huit heures.

Les cultures destinées à la coloration sont préalablement lavées soigneusement à l'eau physiologique. On les fixe ensuite directement sur la lamelle recouverte de la membrane plastique qui a servi comme support pour la culture. Nous employons de préférence comme fixateur le Bouin alcoolique (Bouin-Dubosq-Brazil), agissant pendant au moins deux heures. Les préparations sont lavées ensuite à l'alcool à 96° pendant deux heures. Elles peuvent être sans inconvénient laissées dans le fixateur et, après la fixation, dans l'alcool pendant plusieurs jours.

Ce fixateur nous a donné de meilleurs résultats que la fixation aux vapeurs d'acide osmique que nous employons pour les cultures destinées à l'examen au microscope électronique. La coloration généralement appliquée est celle à l'hémalum-éosine.

Sur les préparations obtenues, les fragments et surtout la zone de néo-croissance apparaissent avec une grande netteté sur le fond légèrement rosâtre de la membrane dont les plis sont parfois visibles.

Le tissu nerveux en culture est généralement suffisamment mince et transparent pour l'examen au fort grossissement dans son ensemble.

Nous décrivons ici les résultats de nos observations sur la culture de quelques tissus.

2° CULTURE DE TISSU NERVEUX. — En raison de l'importance particulière de la culture du tissu nerveux pour l'étude des virus, nous avons insisté sur la culture de ce tissu. Les difficultés techniques généralement liées à la culture du tissu nerveux par les méthodes classiques, ainsi que la complexité de son évolution *in vitro* sont certainement les causes de la rareté de son emploi pour cette étude comme méthode histologique. Nous pensons que l'application du système de culture sur membranes plastiques peut être très précieux pour ce tissu.

Nous employons pour la culture le mésencéphale d'embryon de poulet de dix à treize jours. La difficulté principale consiste ici à obtenir la fixation du fragment de tissu cérébral à la membrane. Son adhérence est généralement mauvaise, probablement à cause de sa grande teneur en matière grasseuse. Les fragments qui n'adhèrent pas pendant les premières vingt-quatre heures à sa surface et nagent librement dans le milieu, restent finalement

dans cet état sans donner une croissance normale. Il suffit, en revanche, que le fragment s'accroche pendant cette période initiale à la membrane par quelques neuroblastes émigrés et leurs prolongements pour que leur croissance soit assurée indéfiniment.

En mettant plusieurs fragments à l'intérieur de chaque anneau, nous obtenons pratiquement partout, au moins une culture. La fixation du fragment contre le support, ne dépend pas de son origine histologique ; nous n'avons pas pu obtenir des résultats plus uniformes à partir de différentes régions du cerveau embryonnaire. Il est très probable que ce phénomène dépend de la forme du fragment et de sa relation surface-volume.

L'interprétation des résultats de culture de tissu nerveux a souvent été l'objet de vives discussions. La détermination du caractère et de l'origine des tissus qui apparaissent au cours de son évolution, constitue un des problèmes les plus délicats de la culture de tissus *in vitro*.

N'ayant pas employé pour nos préparations de colorations spéciales, en particulier l'imprégnation argentique, nous ne pouvons point prétendre leur donner une interprétation complète et définitive.

Nous avons pu constater cependant dans nos cultures, dont l'âge remontait à plusieurs semaines, l'apparition de tous les stades caractéristiques de l'évolution du tissu nerveux en culture décrits par de nombreux auteurs, qui ont cultivé ce tissu en milieu plasmatique (Olivo [1927 et 1928] ; Kopel [1927 et 1929] ; Lazarenko [1931] ; Serebriakow [1935] ; Verne [1930] ; Mihalik [1935] ; Bauer [1938]).

Durant les premières quarante-huit heures, on observe une migration considérable de neuroblastes. Les fibres nerveuses sortant directement du fragment sont assez rares, ce qui est propre à la croissance en milieu contenant un extrait embryonnaire concentré et actif, favorisant plutôt la prolifération des cellules que leur différenciation (Mihalik [1935] ; Olivo [1928]). Assez souvent, on observe des anastomoses entre les neuroblastes émigrés, mais les longues fibres de propagation essentiellement rectilignes ne montrent pas de tendance à s'anastomoser. Ces fibres ont à leur extrémité un bouton terminal visible aussi bien à l'examen à l'état frais que dans les préparations colorées.

Les neuroblastes et le réseau de leurs prolongements peuvent être très bien observés pendant la première semaine de culture. Les neuroblastes de différentes tailles se disposent souvent de façon à réaliser une formation rappelant une membrane épithéliale.

L'apparition de neuroblastes dans la zone périphérique du fragment est accompagnée et surtout suivie par une migration très importante des cellules de la macroglie et de la microglie. Ces cellules ont dans nos cultures une forme arrondie et donnent rare-

ment des ramifications. L'hypertrophie de ces éléments et leur vacuolisation interviennent très rapidement. A cause de leur réfringence à l'état vivant et après fixation aux vapeurs d'acide osmique, les cellules sont très faciles à distinguer des éléments nerveux, ce qui facilite beaucoup le choix des cellules en vue de la microscopie électronique.

Progressivement, grâce à une migration très importante, le

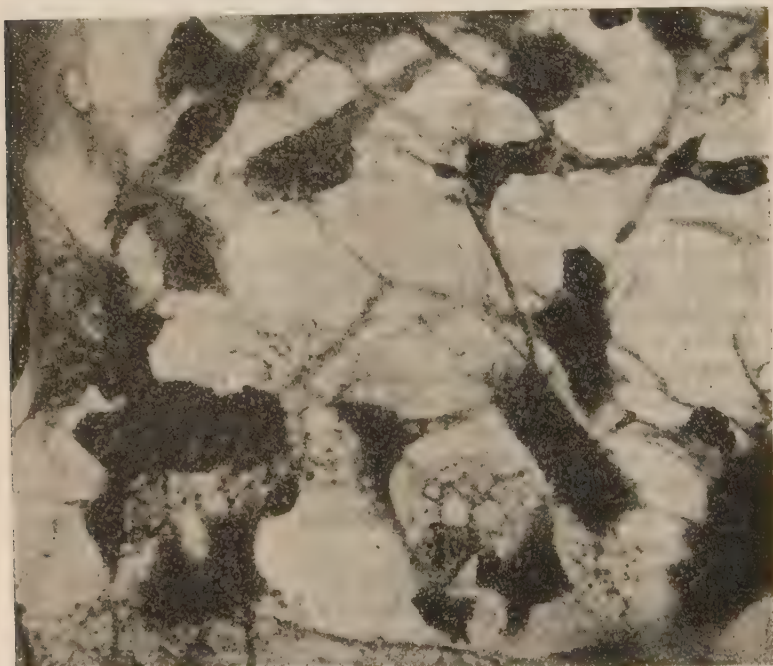


FIG. 1. — Culture de mésencéphale d'embryon de poulet de douze jours. Quatrième jour de culture. Périphérie du fragment. Zone de migration. (Gross. : 4.200.)

milieu du fragment devient plus transparent et la différence entre les agglomérations des éléments gliaux soumis à une dégénérescence très rapide et le tissu neuro-épithélial en pleine vitalité avec nombreuses mitoses, est particulièrement bien visible.

Maksimow, par la suite Kapel (1929) et beaucoup d'autres auteurs ont constaté la dégénérescence de tous les autres éléments histologiques présents dans la culture du tissu nerveux ; un tissu de caractère épithélial reste seul à proliférer et peut être cultivé, probablement indéfiniment.

D'après les données de O. Olivo (1927 et 1928), Kapel (1927

et 1929), Th. Lazarenko (1931) entre autres, les premiers signes de croissance de ce tissu neuro-épithélial apparaissent seulement vers le dixième jour de la culture et sa prolifération abondante commence vers le vingtième jour. Dans nos cultures, cette croissance très vigoureuse apparaît beaucoup plus tôt, vers le cinquième-septième jour et se poursuit ultérieurement. Ce fait reste en concordance avec nos observations antérieures sur la culture de l'épithélium pulmonaire qui trouve, lui aussi, des conditions de croissance particulièrement favorables sur membranes plastiques.

Les membranes du tissu épithélial s'étalent d'une façon diffé-

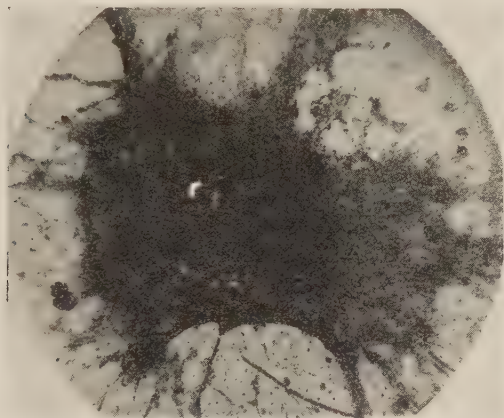


Fig. 2. — Culture de mésencéphale d'embryon de poulet de treize jours. Trente-sixième jour de culture. L'ensemble de la culture. (Gross. : 75.)

rente de celle qu'on observe dans les cultures du tissu épithélial pulmonaire ou rénal. Elles ne forment pas de plaques régulières et uniformes. Les cellules ne se disposent pas en « pavés » et l'ensemble de la culture prend souvent une forme d'étoile très ramifiée.

Nous avons observé fréquemment, dans certaines zones de nos cultures subissant cette particulière recrudescence épithéliale, que les cellules donnent à l'intérieur du fragment des prolongements du type neuroblastique formant un réseau épais et embrouillé rappelant des images observées les premiers jours de la culture.

D'autre part, nous avons pu observer dans une culture de dix-neuf jours, des prolongements protoplasmiques très fins sortant du fragment. Certains de ces prolongements sont courts, cunéiformes et rappellent les formations habituellement observées dans

les cultures du tissu épithélial. D'autres ont un caractère différent : ils forment de très longs filaments atteignant 400 μ , dont les bords marginaux sont parallèles et l'extrémité renflée en « massue » de type Cajal. Ils rappellent donc plutôt les fibres nerveuses.

Il est difficile de se prononcer définitivement sur la nature de

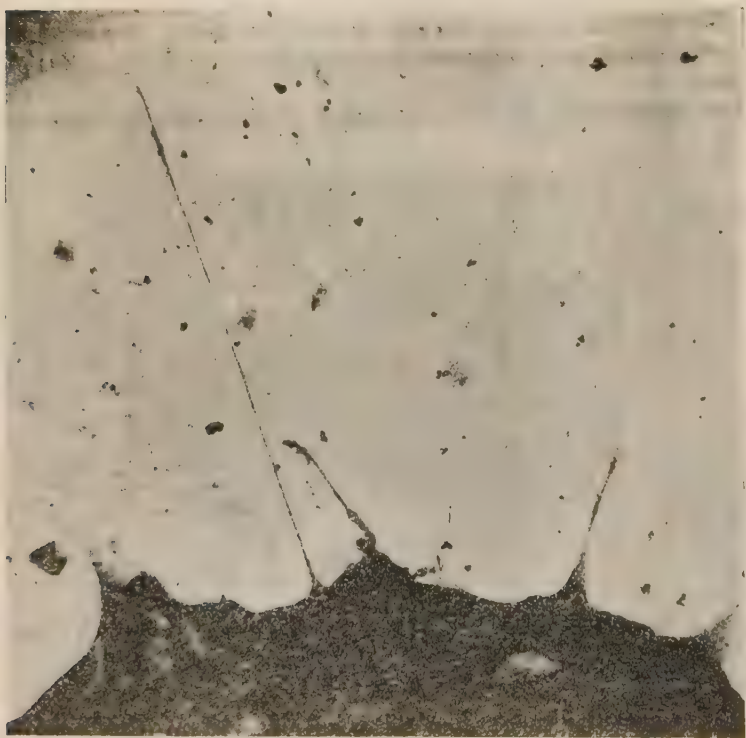


FIG. 3. — Culture de mésencéphale d'embryon de poulet de douze jours. Dix-neuvième jour de culture. Prolongements protoplasmiques sortant de la culture terminés par un épaississement en forme de massue. Le prolongement le plus long mesure 400 μ . (Gross. : 170.)

ces prolongements, n'ayant à notre disposition que des préparations colorées à l'hémalum-éosine.

Nous avons cultivé couramment le tissu nerveux d'embryon de poulet pendant plusieurs semaines. La culture la plus longue a duré trente-cinq jours. Entretienue dans un milieu habituel, elle s'est montrée au trente-cinquième jour dans un état de pleine vitalité, présentant même des mitoses.

En introduisant du virus herpétique dans la culture de tissu

nerveux entretenu en milieu liquide sur membrane plastique, nous avons constaté que le virus peut se fixer et se multiplier dans ces conditions.

Les lésions spécifiques apparaissant dans ces cultures, peuvent être facilement mises en évidence, après une fixation et coloration rapide de l'ensemble de la culture, directement sur la lamelle qui lui a servi de support. Les résultats de cette étude seront publiés prochainement.

3° CULTURE DES FIBROBLASTES. — Les résultats régulièrement positifs obtenus dans la culture de tissu épithélial pulmonaire et

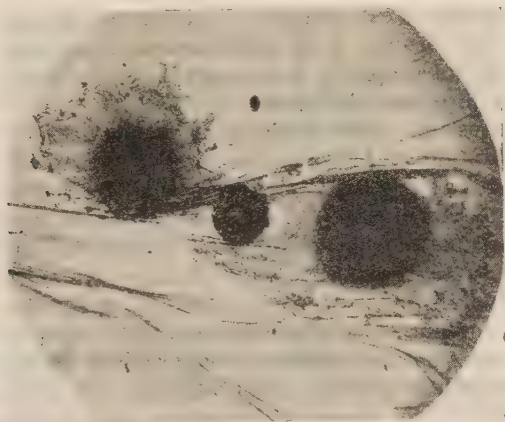


FIG. 4. — Aspect d'une culture de fibroblastes de deux jours.
On voit les plis de la membrane plastique. (Gross. : 75.)

des éléments épithéliaux du tissu nerveux sur membrane plastique pouvaient donner à penser que ces mêmes conditions seraient défavorables pour le développement d'un tissu dans un certain sens opposé : les fibroblastes.

En effet, les techniques employées pour la culture du tissu épithélial qui tend à s'étaler sur la surface du support [Nauck (1936) ; Bland et Robinow (1939) ; Malamos (1938) ; Wirth et Barski (1947)] semblaient toujours défavoriser la croissance des fibroblastes qui prolifèrent activement dans la profondeur du caillot plasmatique.

Les premiers essais que nous avons entrepris nous ont pourtant prouvé que les fibroblastes donnent une excellente croissance dans le milieu liquide approprié, se servant de la membrane de formvar comme support. Les cultures de deux jours montrent une zone de croissance très étendue où les fibroblastes s'étalent

régulièrement, formant ensuite une pseudo-membrane. Cet aspect membraneux des cultures de fibroblastes a été également observé par Grossfeld (1931) qui a cultivé des fragments de cœur d'embryon de poulet à la surface du plasma.

Nous avons entretenu des cultures de fibroblastes dans ces conditions pendant plusieurs semaines. Les fibroblastes prolifèrent abondamment, remplissant presque entièrement le cadre formé par l'anneau.

DISCUSSION.

La culture sur membrane plastique qui paraissait au début (Wirth et Barski) une méthode uniquement adaptée à la culture du tissu épithélial, s'est montrée en fait beaucoup plus générale. La pellicule de formvar peut parfaitement remplacer aussi dans la culture des autres tissus le support apporté dans la technique classique par le réseau de fibrine.

Les avantages de cette solution sont évidents. L'observation directe, la fixation et la coloration de cultures sans l'encombrement de coagulum plasmatique deviennent très faciles et les préparations obtenues très nettes. Nous espérons en particulier pouvoir apporter ainsi de nouvelles connaissances à l'étude de la différenciation du tissu nerveux embryonnaire en culture. La définition de la nature du tissu neuro-épithélial a soulevé, comme on le sait, de nombreuses discussions, sans être définitivement résolue. Certains auteurs comme Olivo (1927 et 1928), Kapel (1927 et 1929), Lazarenko (1931), voient l'origine de ce tissu dans les parties primitives, les moins différenciées du syncylium nerveux embryonnaire et supposent ainsi la possibilité de sa différenciation secondaire. K. Bauer va plus loin et prétend avoir pu observer cette différenciation, c'est-à-dire la formation de fibres nerveuses à partir du tissu neuro-épithélial, dans une culture plus âgée de tissu nerveux. Cette opinion est fortement contestée par d'autres auteurs, surtout Mihalik (1935) qui, se basant sur les excellents et minutieux travaux de Verne (1930), considère le tissu neuro-épithélial comme une formation névrologique.

Il est possible que la facilité de culture du tissu nerveux sur membrane plastique puisse apporter des éléments nouveaux et intéressants à ce problème. Une possibilité toute nouvelle apparaît du fait que des cellules ou leur prolongement peuvent être à tout moment soumises à l'examen au microscope électronique, puisqu'elles se trouvent toujours étalées sur une membrane ultra-fine de formvar. Cette étude est déjà entreprise et nous espérons pouvoir bientôt publier ses résultats.

Quant à l'intérêt de l'examen au microscope électronique de l'évolution de virus à l'intérieur de cellules nerveuses en culture il apparaît tout à fait manifeste.

Cependant, nous considérons qu'il est nécessaire d'apporter à la méthode décrite certaines améliorations. Nous les envisageons dans deux domaines. Premièrement, il nous semble aussi possible que désirable de simplifier et perfectionner à la fois le milieu liquide employé. Le mélange sérum-extrait embryonnaire-liquide Tyrode, doit pouvoir être remplacé par un milieu plus défini et constant à base de sérum ultrafiltré (Simms et Sanders [1941 et 1942], Simms et Stillman [1941]) ou peut-être même un milieu synthétique (White [1946]).

En second lieu, il serait certainement possible de placer nos cultures sur membranes plastiques dans des tubes roulants (roller tubes), en leur assurant ainsi les conditions optima d'échange nutritif.

RÉSUMÉ.

1° En appliquant la méthode de culture en milieu liquide sur un support artificiel formé par une pellicule très fine de matière plastique (formvar), on a cultivé le tissu nerveux et mésenchymateux d'embryon de poulet.

2° Le tissu nerveux cultivé pendant trente-cinq jours, a montré tous les stades caractéristiques de son évolution *in vitro* précédemment décrits. On a pu observer certaines particularités de son évolution.

3° La croissance du tissu mésenchymateux (fibroblastes) a été très régulière, d'une intensité comparable à celle observée en plasma et a pu être continuée sans difficulté pendant plusieurs semaines.

4° Le tissu cultivé sur membranes plastiques et particulièrement le tissu nerveux, peut être avantageusement utilisé pour la culture de virus.

5° Les éléments du tissu nerveux en culture sur membranes plastiques peuvent être aux différents stades facilement examinés au microscope électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUER. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1938, **22**, 38.
BLAND et ROBINOW. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1939, **22**, 453.
DREW. *Brit. J. Path.*, 1922, **3**, 20 ; 1923, **4**, 26.
GEY (G. O.) et GEY (M. K.). *Am. J. Cancer*, 1936, **27**, 45.
GROSSFELD. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1931, **11**, 618 ; 1934, **16**, 317.
LAZARENKO. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1931, **11**, 555.
LEWIS et LEWIS. *Anat. Rec.*, 1912, **6**, 195.
DES LIGNERIS. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1936, **18**, 442.
MAITLAND et MAITLAND. *Lancet*, 1928, **2**, 596.
MIHALIK. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1935, **17**, 119.
KOPEL. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1927, **4**, 143 ; 1929, **8**, 35.

OLIVO. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1927, **4**, 43 ; 1928, **5**, 46.

SEREBRIAKOW. *Zeitschr. Zellforsch.*, 1935, **22**, 140.

SIMMS et SANDERS. *Arch. Path.*, 1942, **33**, 619.

VERNE. La névroglie. *C. R. Assoc. Anat.*, 1930.

WHITE. *Groroth*, 1946, **10**, 131.

WIRTH et BARSKI. *Ces Annales*, 1947, **73**, 987.

WIRTH, ATANASIU, BARSKI et M^{lle} CROISSANT. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 827.

ZAKRZEWSKI. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1934, **45**, 113.

ÉTUDE DE LA RÉACTION DE STICKLAND (1)

(TROISIÈME MÉMOIRE)

par B. NISMAN, M. RAYNAUD et G. N. COHEN.

[Travail du Service des Anaérobies, Institut Pasteur
(Annexe de Garches.)]

Stickland [1], Hoogerheide et Kocholaty [2] ainsi que Aubel, Rosenberg et de Chezelles [3] ont étudié une série de corps susceptibles d'être déshydrogénés par *Cl. sporogenes*. Dans une première partie de ce travail nous avons voulu voir si certains de ces corps, étudiés par les auteurs précédents, pouvaient remplacer l'acide aminé donateur d'hydrogène dans la désamination de la glycine.

Dans une seconde partie nous avons vérifié que la réaction de Stickland se manifestait dans le métabolisme de toute une série de bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives étudiées par nous.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Les suspensions cellulaires de *Cl. sporogenes* ont été préparées suivant notre technique habituelle [4]. Le dosage de l'ammoniaque dégagée a été effectué suivant la méthode de Raynaud et Gros [5].

Nous avons essayé de faire désaminer la glycine en présence de lactate, de formiate et de succinate comme donateurs d'hydrogène. Le tableau I donne nos résultats avec ces corps.

On voit que le lactate, le succinate et le formiate ne peuvent pas servir de donateurs de H_2 pour la désamination de la glycine. Par contre, avec le pyruvate de Na (Stickland [1] avait constaté que le pyruvate pouvait servir à la réduction de la proline), l'éthanol, le glucose et l'acétaldéhyde, ce dernier étant cependant considéré par Hoogerheide et Kocholaty [2] comme un plus mauvais donateur que le lactate de Na, nous avons obtenu des résultats positifs vis-à-vis de la désamination de la glycine. Le tableau II résume nos résultats.

(1) Les deux études précédentes ont paru dans ces *Annales*, 1947, 73, 1003 et 1012.

TABLEAU I.

A	B	C	D
2 cm ³ de glycine M/10 + 1 cm ³ d'alanine M/10 + 6 cm ³ de tampon phosphate M/15 pH 7, + 1 cm ³ de suspension de <i>Cl. sporogenes</i> . Volume total : 10 cm ³ .	Identique à A mais 2 cm ³ de lactate de Na M/10 remplacent l'alanine.	2 cm ³ de formiate de Na M/10 comme donateur.	2 cm ³ de succinate de Na M/10 comme donateur
Résultats exprimés en centimètres cubes de NH ₃ N/10; dosages effectués sur 5 cm ³ après vingt et une heures et correspondant à 1 cm ³ de glycine M/10 + 1/2 cm ³ d'alanine M/10			
A	B	C	D
1,50	0,05	0,05	0,02

TABLEAU II.

Volume total des tubes : 10 cm³.

Chaque tube contient 1 cm³ de suspension de *Cl. sporogenes* + 6 cm³ de tampon phosphate M/15 pH 7 + 2 cm³ de glycine M/10 + 1 cm³ de donateur M/10. Résultats exprimés en millimols de NH₃. Dosages effectués après vingt et une heures d'incubation à 37°.

A	B	C	D	E
Alanine + glycine 28	Pyruvate + glycine 17	Acétaldéhyde + glycine 10,2	Ethanol + glycine 17,4	Glucose + glycine 8,5
(Les valeurs des témoins pour ces différents substrats soit donateur, soit accepteur + suspension, ainsi que celles des germes seuls, ont été défatquées.)				

DEUXIÈME PARTIE.

En dehors des études de Stickland [4], Woods [6], Hoogerheide et Kocholaty [2] et d'Aubel et coll. [3] effectuées avec *Cl. sporogenes*, ainsi que celle de Clifton [7] qui rapporte l'existence de la réaction d'oxydo-réduction entre acides aminés chez *Cl. botulinum*, souches A et B, peu de travaux ont été effectués sur l'existence de cette réaction chez d'autres anaérobies stricts.

Nous avons essayé les espèces anaérobies strictes suivantes : *Cl. flabelliferum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. saprotoxicum*, *Cl. sor-dellii*, *Cl. bifermentans*, *Cl. acetobutylicum*, *Inflabilis indolicus* et

Cl. butyricum. Toutes ces espèces, à l'exception de *Cl. butyricum*, sont protéolytiques. Le tableau suivant rapporte nos résultats avec ces germes.

TABEAU III.

A = 1 cm³ d'alanine M/10 + 2 cm³ de glycine M/10 + 6 cm³ de tampon phosphate M/15 pH 7 + 1 cm³ de suspension bactérienne.

B = A, mais l'accepteur d'hydrogène est la proline.

Dosages effectués après vingt et une heures d'incubation à 37°. Résultats exprimés en millimols NH₃ par litre.

ESPÈCES BACTÉRIENNES	COUPLE D'AMINO-ACIDES UTILISÉS	
	A	B
<i>Cl. histolyticum</i>	22	
<i>Cl. acetobutylicum</i> PC 48.	10,2	
<i>Cl. acetobutylicum</i> FD 11.	15	
<i>Cl. flabelliferum</i>	7,8	
<i>Cl. saprotoxicum</i>		5,8
<i>Cl. sordellii</i>		3,5
<i>Cl. bifementans</i>		3,6
<i>Inf. indolicus</i>		3,7
<i>Cl. butyricum</i>	21	
(Tous les témoins ont été défalqués.)		
Valeur maxima théorique	30	10

TABEAU IV.

A = 2 cm³ d'alanine M/10 + 1 cm³ de tampon phosphate + 1 cm³ de suspension bactérienne (1).

B = 2 cm³ de glycine + 7 cm³ de tampon + 1 cm³ de suspension bactérienne (1).

Dosages effectués après vingt et une heures sur une partie aliquote correspondant à 1 cm³ d'acide aminé M/10. Résultats exprimés en NH₃ M/10.

ESPÈCES BACTÉRIENNES	A (ALANINE)	B (GLYCINE)
<i>Cl. flabelliferum</i>	0,25	0,32
<i>Cl. histolyticum</i>	0,60	0,84
<i>Cl. butyricum</i>	0,43	0,55
(Les témoins ont été défalqués.)		
(1) 1 cm ³ de suspension bactérienne = 8 mg. N bactérien.		

Nous voyons que toutes ces espèces donnent la réaction de Stickland. Les espèces non protéolytiques suivantes : *Cl. saccharobutyricum*, *Cl. iodophilum*, *Pl. tetani*, *Pl. tetanomorphum*, *W. perfringens* et *Inf. teras* ne nous ont donné de réaction de Stickland avec aucun des couples étudiés, que le donateur soit

amino-acide ou non. Dans le cas des espèces donnant cette réaction, nous avons obtenu parfois de fortes désaminations des acides aminés donateurs ou accepteurs seuls, ceci lorsque les suspensions bactériennes étaient deux fois plus denses que d'ordinaire (environ 8 mg. d'azote bactérien par centimètre cube de suspension). Le tableau IV indique nos résultats concernant la désamination de l'alanine et du glycocolle seuls par de telles suspensions.

En chromatographiant les suspensions seules dans du tampon sur papier filtre par la méthode de Gordon, Consden et Martin [8] avec le phénol comme solvant, nous avons constaté qu'il se forme dans les suspensions, par autolyse ou par un autre mécanisme, les acides aminés suivants : acides glutamique et aspartique et alanine. Dès lors, on peut concevoir les résultats du tableau IV comme l'effet d'un couplage entre les substrats étudiés plus haut (alanine, glycine) et les acides aminés formés par les suspensions bactériennes. Nous donnons dans le tableau V les Rf [8] des acides

TABLEAU V.

Tableau des Rf des acides aminés identifiés.

Chromatographie effectuée sur papier Whatman, n° 1, dans du phénol à 95 p. 100.

A = 1 cm³ de suspension + 9 cm³ de tampon phosphate pH 7. Incubation de trois heures à 37°, puis centrifugation et le liquide surnageant est réduit au bain-marie à 2 cm³.

Rf DES ACIDES AMINÉS témoins		Rf DES ACIDES AMINÉS identifiés dans A	
Alanine	0,57	0,57	
Acide aspartique	0,14	0,13	0,14
Acide glutamique	0,24	0,22	0,23

aminés identifiés dans les suspensions bactériennes en comparaison avec ceux d'acides aminés témoins.

Les anaérobies facultatifs suivants sont incapables de dégrader les acides aminés par couple d'oxydo-réduction : *E. coli* (souches II et Selles). *Klebsiella pneumoniae* (souche Gori), *St. aureus* et *P. vulgaris*.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Nous avons obtenu une désamination de la glycine avec les donateurs non amino-acides suivants : éthanol, acétaldéhyde, pyruvate et glucose.

2° Avec le lactate de Na, le formiate de Na et le succinate de Na, nous n'avons pas constaté de désamination de la glycine.

3° Nous avons étendu la réaction de Stickland aux espèces anaérobies strictes suivantes, toutes protéolytiques à l'exception de *Cl. butyricum* : *Cl. flabelliferum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. saprotoxicum*, *Cl. sordellii*, *Cl. bifementans*, *Cl. acetobutylicum*, *Inf. indolicus* et *Cl. butyricum*.

4° Les espèces anaérobies strictes qui suivent ne donnent pas de réaction de Stickland : *Cl. saccharobutyricum*, *Cl. iodophilum*, *Pl. tetani*, *Pl. tetanomorphum*, *Inf. teras* et *W. perfringens*. Tous ces germes ne sont pas protéolytiques.

5° Nous avons montré que la réaction de Stickland n'intervient pas dans le métabolisme des aérobies : *E. coli*, *St. aureus*, *P. vulgaris* et *Klebsiella pneumoniae*.

6° Nous avons pu montrer par chromatographie sur papier filtre qu'il se forme dans les suspensions cellulaires des bactéries anaérobies strictes étudiées, des acides aminés que nous avons identifiés comme étant les acides aspartique et glutamique et l'alanine, qui peuvent se coupler avec des substrats tels que la proline, la glycérine, et entraîner une désamination assez forte de ces dernières.

La nomenclature des anaérobies stricts étudiés ici est celle de A.-R. Prévot (*Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*. Masson, 2° édit., Paris, 1948).

Nous remercions très sincèrement le D^r A.-R. Prévot, chef du service des anaérobies, pour les souches microbiennes qu'il a mises à notre disposition.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STICKLAND. *Bioch. J.*, 1935, **29**, 299 ; *Ibid.*, **29**, 889.
- [2] HOOGERHEIDE et KOCHOLATY. *Bioch. J.*, 1938, **32**, 949.
- [3] AUBEL, ROSENBERG et DE CHEZELLES. *Trav. Membr. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 1358.
- [4] COHEN (G. N.), RAYNAUD (M.), COHEN-BAZIRE (G.) et NISMAN (B.). *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1947, **29**, 644.
- [5] RAYNAUD (M.) et GROS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1004.
- [6] WOODS. *Bioch. J.*, 1936, **30**, 1934.
- [7] CLIFTON. *J. Bact.*, 1940, **39**, 485.
- [8] CONSDEN, GORDON et MARTIN. *Bioch. J.*, 1944, **38**, 244.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 4 mars 1948.

Présidence de M. PREVOT.

COMMUNICATIONS

INFLUENCE DE L'ESTÉRIFICATION SUR LE POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE DES ACIDES GRAS DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE

par J. SOLOMIDÈS.

Dans une série de notes, nous avons montré avec A. Hirsch que les acides gras de l'huile de foie de morue inhibent dans certaines conditions bien déterminées, le développement de certains germes (staphylocoque, pneumocoque, streptocoque et bacille tuberculeux) à des dilutions très élevées (1). Nous avons, par la suite, montré que cette action antibactérienne des savons des acides gras de l'huile de foie de morue était entièrement neutralisée par le sérum, *in vitro* et *in vivo*, chez la souris inoculée avec du pneumocoque (2). Nous avons alors émis l'hypothèse que les acides gras, en se combinant avec les protéines sériques, se trouvent dans l'impossibilité de se fixer sur les microbes et perdent, de ce fait, leur pouvoir bactériostatique. Dans cette note, nous exposons les résultats que nous avons obtenus en estérifiant les acides gras de l'huile de foie de morue par l'alcool éthylique.

Nous avons titré le pouvoir bactériostatique des esters éthyliques des acides gras de l'huile de foie de morue vis-à-vis de 3 microbes : streptocoque, pneumocoque et bacille tuberculeux. A cet effet, avant chaque titrage, nous avons extemporanément solubilisé les esters dans l'alcool éthylique au taux de 1/10 à 1/30. Les dilutions de la solution alcoolique ont été faites en bouillon ordinaire pour les deux premiers germes (pneumocoque et streptocoque), et en bouillon glyciné pour

(1) J. SOLOMIDÈS et A. HIRSCH, ces *Annales*, 1947, 73, 819 et 904 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 238 ; *Rev. Tub.*, 1947, 11, 599.

(2) J. SOLOMIDÈS, ces *Annales*, 1942, 74, 72.

le troisième (le bacille tuberculeux). Dans tous les cas, le milieu de culture a été additionné de 1/30 de sérum de cheval. Voici les résultats obtenus pour chacun de ces microbes :

a) *Streptocoque*. — Les milieux de culture (bouillon ordinaire contenant 1/30 de sérum) additionnés de quantités décroissantes d'esters ont étéensemencés avec 0,1 cm³ d'une culture de streptocoque âgée de vingt-quatre heures, diluée à 1/10.000 dans le bouillon ordinaire. Les résultats ont été enregistrés après dix-huit à vingt heures d'étuve. On observe dans ces conditions que le développement du streptocoque est inhibé à des dilutions de 1/3.000 à 1/5.000 d'esters. Bien entendu, des solutions alcooliques d'acides gras titrées dans les mêmes conditions n'inhibent pas ce germe à des taux de dilution de l'ordre de 1/3.000.

b) *Pneumocoque*. — Dans ce cas, les milieux de culture contenant des taux variables d'esters éthyliques d'acides gras ont étéensemencés avec 0,1 cm³ de culture de pneumocoque diluée à 1/10 dans le bouillon. La dilution active pour dix-huit à vingt heures d'étuve a été de 1/9.000 à 1/15.000. Dans les mêmes conditions, l'action antibiotique des solutions alcooliques de savons d'acides gras se trouve entièrement neutralisée par le sérum, même à des dilutions de l'ordre de 1/3.000.

c) *Bacille tuberculeux*. — Des tubes de bouillon glyciné contenant 1/30 de sérum et des quantités décroissantes d'esters ont étéensemencés avec des fragments de voile de bacille tuberculeux du type humain ou bovin. On observe, au bout de quinze jours, une inhibition du développement de ce germe à des dilutions allant de 1/1.000 à 1/3.000 d'esters. Bien entendu, l'action antituberculeuse des acides gras, titrée dans les mêmes conditions, se trouve à peu près entièrement neutralisée par le sérum.

d) Titrage en bouillon ordinaire ne contenant pas de sérum. Nous avons titré le pouvoir bactériostatique des solutions alcooliques des esters éthyliques des acides gras de l'huile de foie de morue (à 1/10 ou 1/30) vis à vis du streptocoque et du pneumocoque. Des tubes de bouillon ordinaire contenant des quantités décroissantes d'esters ont étéensemencés, soit avec 0,1 cm³ de culture de streptocoque âgée de vingt-quatre heures, soit avec 0,2 cm³ de culture de pneumocoque âgée de vingt-quatre heures. On observe, dans ces conditions, que le développement du streptocoque est inhibé à des dilutions inférieures à 1/5.000. Quant au pneumocoque, son développement n'est pas entravé à des taux de dilution plus faibles que 1/10.000.

En titrant, dans les mêmes conditions, le pouvoir bactériostatique pour les mêmes germes des acides gras de l'huile de foie de morue en solution alcoolique à 1/10, on constate, ainsi que nous l'avons déjà signalé (1), que le streptocoque ne se développe pas à des dilutions de l'ordre de 1/90.000.000 et le pneumocoque, à des dilutions de dix à cent fois plus fortes [à 1/9.000.000.000 environ] (3).

(3) La quantité d'inoculum employée dans les titrages en bouillon ordinaire ou en bouillon ordinaire contenant du sérum varie considérablement avec le microbe. Nous ensemençons, en principe, avec la quantité minima d'inoculum compatible avec un bon développement du germe dans le milieu étudié, en dix-huit ou vingt heures d'étuve.

e, *Influence de l'iodation*. Nous avons iodé les esters éthyliques des acides gras de l'huile de foie de morue en agitant avec la liqueur de Lugol et en chauffant très légèrement pendant une ou deux minutes. Les esters ainsi iodés qui ne contiennent pas d'iode libre sont doués de propriétés bactériologiques considérables qu'on peut mettre en évidence par la technique que nous avons décrite précédemment en détail à propos du distillat d'huile de foie de morue (4). Elle consiste à étaler une culture microbienne en très mince couche dans un tube stérile, à la recouvrir avec l'huile, et puis à repiquer à des délais variables un peu de cette couche microbienne en bouillon ordinaire ou en gélose ordinaire et à observer à partir de quel moment les microbes deviennent inaptes aux repiquages. Nous avons pu ainsi constater que des microbes tels que le staphylocoque ou le colibacille restent vivants dans les esters non iodés pendant six heures environ, alors que les mêmes germes deviennent inaptes aux repiquages après une minute de contact avec les mêmes esters iodés suivant la technique indiquée plus haut. Le bacille typhique, le bacille de Shiga et le bacille diphtérique meurent dans les mêmes délais (d'une minute de contact avec les esters iodés). Quant au bacille tuberculeux, alors qu'il reste vivant pendant plus de six heures de contact avec les esters non iodés, il cesse d'être repiquable sur milieu de Löwenstein après une demi-heure de contact avec les esters iodés. De même, des champignons, tels que le *Penicillium notatum* ou l'*Actinomyces griseus*, qui en suspension dans les esters non iodés ou même dans une solution saturée d'iodure de potassium, restent vivants pendant plus de quatre à six heures, deviennent inaptes aux repiquages sur gélose de Sabouraud après cinq minutes de contact avec les esters iodés.

Cette notable augmentation par simple iodation du pouvoir bactéricide des esters éthyliques des acides gras de l'huile de foie de morue nous a incités à titrer le pouvoir bactériostatique de ces esters iodés vis-à-vis du streptocoque, du pneumocoque et du bacille tuberculeux.

Nous avons employé la technique que nous avons indiquée précédemment à propos de chacun de ces microbes, mais ces titrages n'ont montré aucune augmentation appréciable du pouvoir bactériostatique de ces corps.

Conclusions. — Le blocage par estérification de leur fonction acide fait perdre aux acides gras de l'huile de foie de morue la plus grande partie de leur activité bactériostatique vis-à-vis de germes tels que le streptocoque, le pneumocoque et le bacille tuberculeux.

Cependant, à l'opposé de ce qui se passe avec les savons alcalins des acides gras de l'huile de foie de morue, les esters éthyliques de ces acides gras conservent un certain pouvoir bactériostatique vis-à-vis des germes que nous venons de citer, même en présence de sérum.

Ce pouvoir bactériostatique peut être évalué à 1/9.000 à 1/15.000 pour le pneumocoque, à 1/3.000 pour le streptocoque et 1/1.000 à 1/3.000 pour le bacille tuberculeux.

L'iodation à saturation par la liqueur de Lugol n'affecte pas le pouvoir bactériostatique de ces corps, mais augmente considérablement leur pouvoir bactéricide et mycocide. Des microbes tels que le staphylo-

(4) J. SOLOMONIDES, *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 839 et séance du 13 décembre 1947.

coque, le colibacille, le bacille tuberculeux, l'*Act. griseus* et le *Pen. notatum* nécessitent un contact de plusieurs heures avec les esters non iodés pour devenir inaptes aux repiquages. Or, en contact avec les esters iodés, le colibacille et le staphylocoque deviennent inaptes aux repiquages au bout d'une minute, les champignons cités en cinq minutes et le bacille tuberculeux en trente minutes.

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

SUR LA SOLUBILISATION DANS L'EAU DE CERTAINES HUILES ET L'INJECTION INTRAVEINEUSE D'HUILE DE FOIE DE MORUE AU LAPIN ET A L'HOMME

par J. SOLOMIDÈS.

L'étude du pouvoir bactériostatique des huiles a été rendue difficile, sinon impossible, par l'insolubilité de ces corps dans les milieux de culture. De même, l'injection parentérale de ces corps, et en particulier leur introduction intraveineuse dans l'organisme, s'est toujours heurtée à des obstacles insurmontables. Il nous a donc semblé intéressant de tenter de solubiliser certaines huiles dans l'eau à l'aide de certains émulsionnants modernes tels que l'émulsoy O (1) qui est fabriqué en France, et les tweens américains.

1° *Procédé de solubilisation après iodation préalable.* La solution de l'huile de foie de morue dans l'émulsoy à des taux variant de 1/5 à 1/10 donne, après dilution dans l'eau distillée, des émulsions plus ou moins grossières et instables. Cependant, nous nous sommes vite aperçu qu'après iodation préalable de l'huile de foie de morue, de chaulmoogra ou d'olive, on peut obtenir non seulement des émulsions stables, mais aussi, dans certaines conditions, des solutions dans l'eau homogènes et limpides. A cet effet, l'huile iodée est mélangée avec de l'émulsoy O en chauffant très légèrement. Le mélange homogène ainsi obtenu est alors dissous dans l'eau. Le mélange émulsoy-huile s'y dissout entièrement et l'on obtient des solutions limpides, homogènes et stables si les conditions suivantes ont été observées :

a) L'huile doit être suffisamment iodée. Nous opérons avec une huile iodée à saturation par la liqueur de Lugol. On agite l'huile avec cinq fois son volume de liqueur de Lugol en chauffant légèrement (40 à 50°) pendant une à deux minutes, puis on la laisse en contact avec cette liqueur à la température du laboratoire pendant sept à huit heures. La composition de la liqueur de Lugol employée est la suivante : Iode 1 g., Iodure de potassium 2 g., eau 20 cm³.

(1) D'après les renseignements sommaires que nous avons pu obtenir de la Société Sovilo qui fabrique l'émulsoy O, ce produit résulte de l'estérification d'acides gras avec un polyéthylène-glycol. Il a des fonctions alcool secondaire et son poids moléculaire est de 2.500.

b) L'huile doit être iodée de fraîche date. Après un séjour de sept à dix jours à la température du laboratoire, l'huile iodée traitée comme nous venons de le dire plus haut, ne donne plus des solutions, mais des émulsions plus ou moins épaisses.

c) Le taux de dilution de l'huile iodée dans l'émulsoy ne doit pas être plus fort que 1/10. L'émulsoy contenant 1/5 ou 1/3 d'huile iodée donne, après dilution dans l'eau, des émulsions troubles et stables, mais jamais de vraies solutions homogènes et limpides.

Des solutions d'huile de foie de morue obtenues suivant les indications que nous venons de donner et contenant 1/30 ou 1/50 de cette huile ont été injectées à raison de 5 à 10 cm³ dans la veine du lapin à plusieurs reprises. Aucun de nos lapins ainsi traités n'a présenté le moindre trouble pendant ou après l'injection. Il en est de même pour l'homme. Le détail du traitement intraveineux de l'homme par l'huile de foie de morue paraîtra plus tard, mais nous pouvons affirmer dès maintenant que ce traitement apparaît absolument inoffensif.

Nous avons aussi réussi à solubiliser l'huile de foie de morue et l'huile de chaulmoogra, dans les mêmes conditions que précédemment en substituant à l'émulsoy O, le tween 80 ou 60 (2).

2° *Procédé de solubilisation sans iodation préalable.* Nous avons mis à profit le fait que l'éther sulfurique mélangé avec son volume d'émulsoy, devient soluble à n'importe quelle dilution dans l'eau sans modification chimique préalable (sans iodation). A cet effet, au mélange éther-émulsoy à volumes égaux, nous ajoutons de l'huile de foie de morue ou de chaulmoogra au taux de 1/10 et puis on mélange avec de l'eau. On obtient ainsi des solutions contenant 1/30 ou 1/50 d'huile, parfaitement bien tolérées en injection intraveineuse au lapin, tant que la quantité totale d'éther injectée avec la solution d'huile de foie de morue ne dépasse pas 0,4 à 0,5 cm³, soit 0,2 cm³ environ par kilogramme de poids vif. Nous avons observé, en effet, que les lapins qui reçoivent par voie intraveineuse de fortes doses de solution d'éther préparée suivant le procédé indiqué plus haut, peuvent succomber immédiatement après l'injection ou présenter de la dyspnée ou de la somnolence passagères.

Conclusions. Les huiles étudiées (huile de foie de morue, huile de chaulmoogra) peuvent être solubilisées dans l'eau par deux procédés différents dont l'un a recours à l'iodation préalable et l'autre exige la solubilisation préalable de l'huile dans le mélange émulsion-éther sulfurique.

Les solutions dans l'eau de l'huile de foie de morue iodée sont injectables dans la veine du lapin et de l'homme sans le moindre accident. Dans le cas où l'éther aide à solubiliser l'huile de foie de morue non iodée, il importe de ne pas injecter au lapin plus de 0,5 cm³ d'éther.

La solubilisation des huiles dans l'eau nous a permis d'entreprendre l'étude du pouvoir bactériostatique de certaines d'entre elles. Nous espérons pouvoir bientôt en rapporter les résultats.

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

(2) Nous rappelons que les tweens sont des dérivés polyalkyléniques des esters de l'acide oléique avec l'anhydride du sorbitol. Comme l'émulsoy O, ils sont solubles dans l'eau

ÉTUDE SUR *ACTINOBACTERIUM ABCESSUS* (NESCHEZADIMENKO) P. 1938 (1)

par M. RAYNAUD, L.-A. ROBIN et P. DE LAJUDIE.

Dans le cadre d'un travail d'ensemble du Service des Anaérobies, nous avons isolé, à partir de l'affection stomatologique dont les observations sont rapportées par ailleurs (2) en détail, 2 souches d'*Actinobacterium abscessus*. La première a été obtenue dans le pus d'un phlegmon du plancher de la bouche (malade B... D^{rs} Lachronique et Béal) souche 313 B et la seconde dans une actinomyose cliniquement typique (malade V... D^{rs} Lachronique et Béal) souche 319 A. Nous nous proposons, grâce à ces 2 souches, d'apporter quelques précisions sur les caractères de cette espèce anaérobie, encore mal connue.

La *Morphologie* est analogue à celle des autres *Actinobacterium* : bâtonnets Gram-positifs polymorphes, avec renflements en massues et sphéroïdes sessiles. Isolés ou en amas, ramifiés. Les dimensions sont variables, 0,5 μ , de large en moyenne, avec grandes variations pour la longueur : 4,5 μ (formes courtes), 7 à 14 μ (formes moyennes), 16 μ à 45 μ (formes longues). Immobilité. Asporulé.

Physiologie. — Anaérobie strict. Thermorésistance faible ou nulle : une souche 313 B est tuée à 70°, l'autre 319 A n'est tuée que par chauffage pendant trente minutes à 80°. Longévité : deux mois au moins.

Cultures. — Lentes, non gazogènes.

Pour les premières cultures, le milieu doit être additionné d'extrait globulaire ou de sérum, mais par la suite, le germe pousse sur le milieu VF glucosé ordinaire.

Gélose profonde : colonies soit irrégulières (313) soit lenticulaires simples ou composées (319) de dimensions variables dans un même tube. Pas de gaz.

En eau peptonée : cultures nulles ou très maigres.

En bouillon glucosé, lors des premiers repiquages, le liquide reste clair et la culture se fait en grumeaux. Pas de gaz. Par la suite, une des souches a donné un trouble fugace avec dépôt rapide, surmonté d'un liquide clair.

La gélatine n'est pas liquéfiée.

Le lait est coagulé par une des souches (313 B) en quatre jours. L'autre souche (319) ne le coagule pas. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées.

Les glucides suivants : glucose, lévulose, galactose, lactose, maltose, saccharose sont attaqués fortement, tandis que le mannitol, le sorbitol, l'amidon ne sont touchés que faiblement et le glycérol irrégulièrement (une souche sur deux).

(1) NESCHEZADIMENKO, *Zentrabl. Bakt.*, 1908, 46, 573. -

(2) LACHRONIQUE, A. R. PRÉVOT, BEHAL et GOUDARD, *Rev. Stomatologie*, 1948 (sous presse).

Le rouge neutre, la safranine, la phénosafranine ne sont pas réduits. Une souche (313) réduit les nitrates en nitrites, l'autre non.

Biochimie. — La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 ne produit ni indol, ni scatol. Il se forme de l'acétylméthylcarbinol dont la présence constitue ainsi un caractère de groupe commun à toutes les espèces connues du genre *Actinobacterium* (*israeli*, *mayeri*, *abscessus*). NH_3 : 0,0013 g. à 0,010 g. pour 100 cm^3 .

Acide volatil formé ; acide acétique pur (0,020 g. à 0,034 pour 100 cm^3).

Présence d'acide lactique.

Pouvoir pathogène expérimental. — Nul. Pas de troubles ni de lésions après inoculation au cobaye. Ni toxine, ni hémolysine.

Position dans la systématique. — Bâtonnet anaérobie asporulé, présentant des ramifications et des renflements en massue. Immobiles. Gram-positifs, ces germes appartiennent au groupe des Actinomycétales Gram-positives qui comprend les 2 genres suivants : *Actinobacterium* et *Bifidobacterium* (3). L'absence de bifurcations terminales permet de classer nos 2 souches dans le genre *Actinobacterium*, Haas (1906), qui compte 3 espèces, *A. israeli*, *A. mayeri*, *A. abscessus*.

Elles se distinguent d'*A. israeli* par l'absence d'hémolysine et de pouvoir pathogène expérimental et d'*A. mayeri* par certains caractères cultureux : *A. mayeri* est sérophile obligatoire et donne en bouillon un trouble homogène.

Les deux souches que nous avons isolées présentent quelques disséminances et la souche 319 A doit être considérée, par rapport à l'espèce-type comme une variété se distinguant par les caractères suivants : absence de coagulation du lait et de réduction des nitrates en nitrites, colonies lenticulaires en gélose profonde.

(Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur. Dr A.-R. Prévot.)

ÉTUDE CYTOLOGIQUE DES SPHÉROÏDES DE *SPHEROPHORUS FUNDULIFORMIS*

par A.-R. PRÉVOT et M. RAYNAUD.

Les méthodes nouvelles de coloration de la substance nucléaire des bactéries ont apporté un regain d'actualité à l'étude des sphéroïdes des *Spherophoraceae* et en particulier de *Spherophorus funduliformis*. Mais il ne faut pas oublier que cette formation avait déjà attiré l'attention des premiers bactériologistes, en particulier de Hallé, qui l'a décrite minutieusement en 1898 (1), ainsi que Rist (2), Guillemot (3) et les collaborateurs de Veillon. Ils en avaient donné des figures qui, aujourd'hui encore, gardent leur intérêt, avaient comparé la substance

(3) A. R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édit. Masson, Paris, 1948, 249.

(1) HALLÉ, *Thèse de Paris*, 1898.

(2) RIST, *Thèse de Paris*, 1898.

(3) GUILLEMOT, *Thèse de Paris*, 1898.

chromatique qu'ils avaient mise en évidence au noyau des leucocytes, remarqué les formes variées qu'elle affecte, formes qui rappellent certaines lettres grecques, ce qui les avait incités à leur donner les noms de « *theloides* », « *tetaliotaomicon* » etc. Plusieurs même avaient émis l'hypothèse qu'il s'agissait de substance nucléaire et lui avaient appliqué la méthode de Romanowsky-Giemsa, qui la mettait particulièrement bien en évidence.

Dienes et ses collaborateurs (4) depuis 1942, ont étudié la cytologie des sphéroïdes de *Sph. funduliformis* dont ils ont d'abord décrit la germination : contours irréguliers, déchiquetés, fragmentation en 2, 3 ou 4 segments, formation de filaments qui s'allongent en bâtonnets réguliers ou se ramifient, puis se divisent. Ce sont d'après eux des organes reproducteurs. A ce titre, ils ont appliqué à leur étude la réaction de Feulgen qui a démontré la présence de chromatine (5) rassemblée en une ou plusieurs masses de formes variées. Cette chromatine a les caractères de la substance nucléaire. Smith (6) a vu naître les sphéroïdes soit d'un seul bâtonnet, soit de la fusion de 2 bâtonnets préalablement renflés au point de contact. Après examen de trois en trois heures et coloration par le Giemsa, il voit la chromatine émigrer vers les renflements. Puis la membrane de séparation disparaît et enfin les corps bacillaires eux-mêmes, pour ne laisser que le renflement qui, libre, devient un sphéroïde où la substance nucléaire se rassemble en masses. Puis se fait de nouveau une segmentation du sphéroïde où chaque élément emporte quelques granules de substance nucléaire. Il s'agit d'une ébauche de sexualité.

Nous avons repris cette question, mais cette fois avec la méthode de coloration de Robinow (7). Les germes ont été recueillis par centrifugation après culture en bouillon VF additionné de sérum. L'étalement sur lame est fixé à l'alcool et hydrolysé à 60° par l'acide chlorhydrique normal pendant dix minutes. On colore ensuite au Giemsa. Les formations nucléaires observables dans les sphéroïdes par cette technique sont plus petites que celles que l'on voit avant l'hydrolyse. Elles se détachent avec netteté sur le fond très peu coloré du reste du sphéroïde et se présentent sous des aspects variés, dont l'interprétation la plus vraisemblable est qu'ils correspondent à des stades différents d'un cycle.

Sur la photographie de l'une de nos préparations nous avons pu suivre tous ces stades de l'évolution de la substance nucléaire : 1° formation de granules intra-sphéroïdaux, 2° migration de ces granules vers la périphérie, 3° étalement, 4° et 5° allongement de la substance chromatique sous la membrane sphéroïdale, 6° et 7° sortie d'un granule à travers une issue de la membrane, 8° le granule sorti s'allonge et par germination reproduit la forme bacillaire.

Ainsi les *Spherophoraceae* auraient 2 cycles évolutifs :

1° Un cycle simple, schizogonique,

(4) L. DIENES, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1941, 47, 385, et 1942, 51, 297 ; *J. Bact.*, 1942, 44, 37 et 1943, 45, 21.

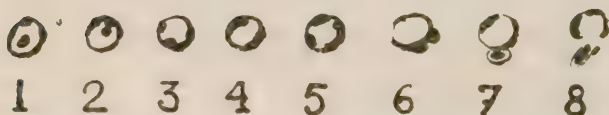
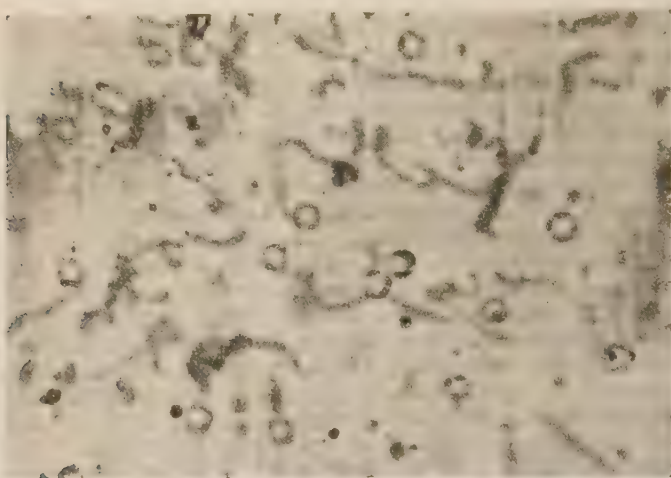
(5) L. DIENES et W. SMITH, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1943, 53, 195 ; *J. Bact.* 1944, 48, 125.

(6) SMITH, *J. Bact.*, 1944, 47, 417.

(7) ROBINOW, *Proc. Roy. Soc. London B.*, 1942, 130, 299.

2° Un cycle plus complexe comportant une ébauche de sexualité avec ébauche de conjugaison, formation de sphéroïdes libres et mise en liberté de corpuscules nucléaires germant et reproduisant la forme bacillaire.

Les *Spherophoraceae*, différenciées par leurs sphéroïdes où la subs-



Au-dessus, sphéroïdes de *Sph. funduliformis* colorés par la technique de Robinow. (Cliché Guichard.) Au-dessous, le cycle évolutif de ces sphéroïdes.

tance nucléaire est facile à mettre en évidence, se distinguent donc nettement des *Eubacteriales*, non différenciées. Comme par ailleurs elles présentent des caractères très nets d'*Actinomycetales*, il était logique de les rattacher à cette classe (8), dont elles constituent les formes Gram-négatives, jusqu'ici toutes anaérobies, sauf le sous-genre *Haverhillia*, espèce-type *moniliformis*, facultative.

(8) A. R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e éd., 226.

APPAREILLAGE ET TECHNIQUE D'ENREGISTREMENT ET DE RÉGULATION AUTOMATIQUE DU PH ET DE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES MILIEUX DE CULTURE

par A. KEPES.

Notre appareillage est composé d'un amplificateur de mesure pour courant continu et d'un potentiomètre enregistreur à 6 directions, fabriqués par la maison Meci.

Le problème qui s'est posé à nous a consisté à pouvoir enregistrer 6 courbes simultanées avec le seul amplificateur. Ce but a été atteint par un commutateur actionné par relais commandé par le potentiomètre enregistreur, de telle sorte, qu'à chaque minute il branche sur l'amplificateur l'un des 6 circuits de mesure successifs. Les circuits de mesure sont constitués par une électrode au calomel mise à terre ainsi que le reste des installations d'une part, par une électrode de verre pour le pH ou une électrode de platine pour le potentiel d'oxydo-réduction d'autre part. Cette dernière électrode est reliée à l'amplificateur par un fil blindé pour le protéger contre les perturbations parasites. Le blindage doit être continu de l'électrode jusqu'à l'amplificateur. Donc, le commutateur doit établir 3 contacts : 1 pour chacune des électrodes du circuit et 1 pour le blindage.

Le potentiomètre possède deux échelles : l'une de 200 millivolts avec la précision du millivolt, ce qui convient pour l'électrode de verre dont la précision est du même ordre ; l'autre, de 1.000 millivolts avec la précision de 5 millivolts, convient à l'électrode de platine dont les résultats ne sont reproductibles qu'à 10 ou 20 millivolts près dans un milieu aussi complexe et inhomogène qu'une culture microbienne.

Le principe des mesures est le même que dans le pont de Poggen-dorf. C'est une méthode de zéro, avec un galvanomètre à cadre mobile comme instrument de zéro. Le zéro est atteint après 5 à 10 tâtonnements de l'appareil automatique, environ 1 chaque seconde. Un potentiel équivalent est alors opposé au potentiel mesuré. Aucun courant ne passe dans le circuit ; le reste de la minute consacré à la mesure permet de contrôler l'absence de polarisation de l'électrode de mesure par l'immobilité du potentiomètre. La *polarisation* est en effet réduite au minimum grâce à :

La *résistance* du circuit, de l'ordre de 100 megohm pour l'électrode de verre ; pour l'électrode de platine, une résistance supplémentaire de 30 megohm est intercalée.

Au fait que les électrodes de mesure ne débitent que la valeur du *courant grille* de l'amplificateur.

Et enfin à la *méthode de 0* du potentiomètre.

Nous avons surtout appliqué la technique de culture *aérobie* en milieu liquide avec barbotage d'air qui assure l'agitation et l'homogénéité du milieu ; mais en milieu non agité ou en milieu *anaérobie* avec barbotage d' N_2 , la même méthode est applicable. La culture est placée dans une étuve ou dans un bain-marie, les électrodes sont aseptisées par lavage à l'alcool et flambage rapide.

Nous pouvons obtenir ainsi 6 courbes simultanées de culture permettant un travail en série, en variant une condition de culture dans des échantillons, par ailleurs identiques. Les courbes sont composées de points isolés espacés de 6 minutes en 6 minutes et marquées d'un numéro permettant de les distinguer.

On peut réaliser d'autres combinaisons avec enregistrement toutes les trois, deux ou une minutes, ceci est utile pour l'observation de phénomènes assez rapides. En effet, la courbe de pH d'une culture peut varier, en pleine phase de croissance, dans un milieu peu tamponné, de 3 à 6 millivolts par minute, correspondant jusqu'à 6 unités pH à l'heure.

Notre dispositif de régulation automatique comprend un petit flacon pissette contenant une base, un acide, un réducteur ou un oxydant suivant les cas, relié au récipient de culture par un siphon capillaire qui reste amorcé en permanence. Une électrovalve admet à ce flacon pissette l'air comprimé pendant une fraction de seconde chaque fois qu'elle est actionnée par le potentiomètre enregistreur. Sur ce dernier on règle à l'avance un maximum ou un minimum selon l'allure prévue de la courbe, et chaque fois que le potentiel dépasse ce point déterminé, il y a addition de quelques gouttes de réactif à la culture pour contrebalancer la variation de potentiel. On obtient ainsi une courbe en dents de scie dont on peut varier la largeur et la fréquence en variant la concentration du réactif, le calibre du siphon capillaire et la pression de l'air comprimé.

Cet appareillage permet :

De suivre qualitativement la croissance microbienne par la variation de pH en milieu peu tamponné, quand le sens de cette variation est connu.

D'étudier l'allure et les anomalies des courbes de pH ou de eH et leurs rapports avec d'autres facteurs, la relation de ces variations avec les phases du métabolisme microbien, de surprendre des phénomènes passagers comme nous le montrerons dans une prochaine communication.

La régulation automatique permet d'étudier les phénomènes biologiques en fonction du pH sans ajouter au milieu de grosses quantités de phosphates pour les tamponner à pH constant.

Peut-être pourrait-on trouver des applications analogues en ce qui concerne le eH.

(Institut Pasteur, Service des Fermentations.)

**ACTION DU VENIN DE *NAJA TRIPUDIANS*,
DE *VIPERA ASPIS* ET DE *VIPERA RUSSELLII* (DABOIA)
SUR LE CYTOPLASME DES BACTÉRIES**

par P. BOQUET et Y. LEHOULT.

Contrairement à l'opinion selon laquelle le protoplasme des microbes est homogène, Badian, suivi de Piekarski puis de Neumann, affirme que les bactéries en voie de croissance contiennent des grains de chromatine. Plus près de nous, Robinow (1) découvre dans les corps microbiens, soumis à l'action de l'acide chlorhydrique et colorés par la solution de Giemsa, des éléments différenciés qu'il compare à des noyaux.

R. Vendrely, seul ou en collaboration avec R. Tulasne (2), décèle enfin des organites semblables dans les bacilles traités par la ribonucléase qui détruit spécifiquement les acides nucléiques du cytoplasme, sans altérer ceux du noyau.

Les venins sont doués de propriétés enzymatiques diverses. Ils dissolvent la gélatine et dédoublent la lécithine en lysocithine et en acide oléique. Certains hydrolysent les acides nucléiques (3), d'autres inactivent le coenzyme de quelques déshydrogénases par un processus nucléotidasique (4). Dans quelle mesure sont-ils capables de lyser le protoplasme des bactéries ?

Dès 1938, E. Rousseau et J. Pascal (5), en faisant agir sur des streptocoques la lysocithine préparée à partir du venin de Cobra ou du venin de Vipère, observent leur destruction. Une partie du protoplasme résiste cependant à l'action lytique du venin. Cette observation fait naître dans l'esprit des observateurs l'hypothèse que les microorganismes étudiés renferment un noyau.

En nous fondant sur les expériences de Robinow et sur celles de Tulasne et de Vendrely, nous avons comparé l'action des venins de *Naja tripudians*, de *Viperia aspis* et de *Vipera russellii* (Daboïa) sur *Escherichia coli*.

Les bacilles examinés proviennent d'une culture âgée de trois heures sur gélose. Les étalements sont fixés par l'alcool absolu, recouverts d'une solution de venin à 2,5 p. 1.000, à 5 p. 1.000, ou à 10 p. 1.000 et maintenus à 37° pendant quinze, trente et quarante-cinq minutes.

(1) C. F. ROBINOW, Nuclear apparatus and cell structure of rodshaped bacteria - in DUBOS (R.), *The bacterial cell*, Harvard University monograph, 1947, 355.

(2) R. VENDRELY, *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **221**, 648 et 1946, **223**, 342. — R. TULASNE et R. VENDRELY, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 674.

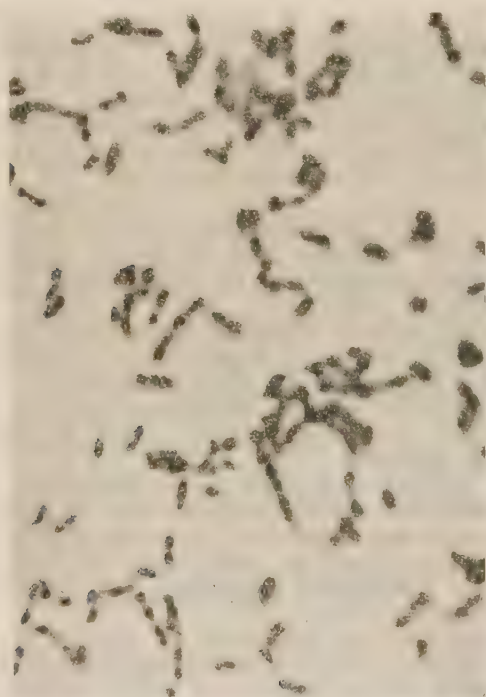
(3) C. DELEZENNE et H. MOREL, *C. R. Acad. Sci.*, 1910, **168**, 244.

(4) E. CHAIN, *Quart. J. exp. Physiol.*, 1937, **26**, 299 ; *Biochim. J.*, 1937, **33**, 407. — E. CHAIN et J. GOLDWORTHY, *Quart. J. exp. Physiol.*, 1938, **27**, 375.

(5) E. ROUSSEAU et J. PASCAL, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 63.

Après un dernier lavage à l'eau distillée ils sont colorés par la solution de Giemsa.

Sur les préparations traitées pendant quarante-cinq minutes par le venin de *Naja tripudians* ou le venin de *Vipera aspis*, à des concentrations variant entre 2,5 et 10 p. 1.000, *E. coli* reste homogène. Au contraire, lorsqu'il est soumis pendant trente minutes à l'action d'une solution à 5 p. 1.000 de venin de *Vipera russellii*, son cytoplasme ne fixe plus les teintures basiques. Il reste clair, et contient des éléments



Éléments nucléaires dans les corps bactériens d'*Escherichia coli* traités par le venin de Daboia.

nucléaires cocciformes, relativement volumineux, isolés, disposés par paires ou groupés comme les grains d'un chapelet et intensément colorés en bleu violet.

Dans le dessein d'établir une comparaison entre la ribonucléase qui résiste au chauffage à 100° et le venin de *Vipera russellii*, nous avons porté à l'ébullition pendant dix minutes des solutions de ce venin à 10 p. 1.000 et à 20 p. 1.000. À la même concentration que le venin frais ou à des concentrations quatre fois plus fortes, le venin chauffé n'exerce aucune action lytique.

De l'ensemble de ces recherches nous pouvons conclure que le venin de la Vipère de Russell altère le cytoplasme d'*E. coli*. Cette propriété

permet de déceler dans les corps microbiens des corpuscules basophiles comparables aux éléments nucléaires de Robinow.

En raison des analogies que présentent les altérations des micro-organismes soumis à l'action du venin de *Vipera russellii* et le processus observé par Tulasne et Vendrely, on est autorisé à penser que le poison de Daboïa libère vraisemblablement les acides ribonucléiques du cytoplasme, mais nous devons convenir que le mécanisme intime de l'action du venin sur les bactéries échappe encore à nos investigations.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

ÉTUDE DE LA BIRÉFRINGENCE D'ÉCOULEMENT D'UNE PROTÉINE COMBINÉE A DU CUIVRE PUIS DÉBARRASSÉE DE CE MÉTAL PAR DIALYSE EN PRÉSENCE DE CYANURE

par J. LESSIAU, R. CERF et M. MACHEBOEUF.

La combinaison des protéines avec du cuivre modifie leur solubilité. Il peut en découler d'intéressantes applications pour le fractionnement des protéines. Mais il fallait pouvoir arracher ensuite le cuivre en retrouvant les protéines intactes. La simple dialyse en présence de cyanure nous a donné de bons résultats. Ainsi avons-nous pu faire cristalliser de l'albumine après l'avoir débarrassée du cuivre. Il s'agit de savoir si l'albumine ainsi traitée n'est pas modifiée. Dans le présent travail, on a recherché les modifications éventuelles à l'aide de mesures de biréfringence d'écoulement (1).

Le principe des mesures est le suivant : la solution à étudier est placée entre deux cylindres coaxiaux, l'un fixe (le cylindre extérieur), l'autre mobile (le cylindre intérieur). On fait passer dans la solution parallèlement aux génératrices des cylindres un faisceau de lumière polarisée et l'on étudie, par les méthodes classiques, la biréfringence de la solution mise en écoulement par la rotation du cylindre intérieur. Lorsque la solution montre de la biréfringence, elle se comporte comme un milieu anisotrope dont deux lignes neutres se trouvent dans un plan perpendiculaire aux génératrices des cylindres.

La protéine utilisée était de la sérum-albumine de cheval, cristallisée et purifiée par trois cristallisations successives. Nous avons étudié sa pureté par électrophorèse (2). La figure 1 représente le diagramme obtenu (pH 8,65 ; tampon véronal-acétaté ; force ionique : 0,1). Ce diagramme nous prouve que notre purification a été très effective puisque la seule impureté décelée est un peu d' α -globulines dont la proportion est seulement 7,7 p. 100. Nous avons étudié la biréfringence d'écoule-

(1) SADRON, J. *Physique et Radium*, 1936, Série VII, 263

(2) LESSIAU, VIOLIER, MACHEBOEUF. Note en rédaction.

ment d'une série d'échantillons protéiques. Certains avaient subi la combinaison avec du cuivre puis avaient été débarrassés de ce métal par dialyse en présence de cyanure. D'autres qui servaient de témoins avaient subi seulement l'action du cyanure et du cuivre. Nous avons opéré la fixation du cuivre à divers pH. Elle était obtenue en mettant en contact la solution protéique (à 2 p. 100) avec de l'hydrate de cuivre stable type Pelligot (3). Après vingt-quatre heures, l'excès d'hydrate était éliminé par centrifugation. Lorsque nous voulions enlever le cuivre combiné, nous ajoutions à la solution 6 p. 100 de cyanure de potassium, puis nous soumettions aussitôt le liquide à la dialyse à volume constant (sous pression convenable) contre du tampon carbonate-bicarbonate M/30 à pH 8,65. Le tampon était changé fréquemment

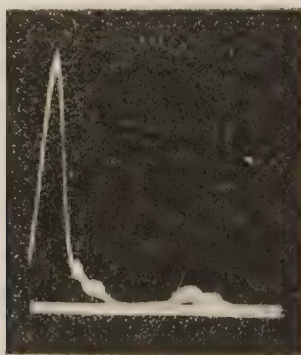


Fig. 1.

jusqu'à élimination totale du cuivre et du cyanure (durée cinq jours).

Dans le tableau A, nous indiquons l'absence de biréfringence par le signe +.

TABLEAU A

SOLUTIONS ÉTUDIÉES	pH LORS DE LA FIXATION DU CUIVRE		
	8,65	11,2	11,9
Solutions témoins sans cuivre mais portées aux pH correspondants . .	0	0	0
Solutions avec cuivre mais non traitées avec le cyanure	0	Couleur violette empêche les mesures.	
Solutions dont le cuivre a été enlevé par le cyanure	+		
Solutions n'ayant pas fixé de cuivre mais traitées au cyanure	+	+	+

3) PELLIGOT, *C. R. Acad. Sci.*, 1867, 53, 213.

Si la combinaison avec le cuivre ne fait pas apparaître de biréfringence d'écoulement, l'action du cyanure au contraire fait apparaître une nette biréfringence. Les lignes neutres sont à 45° de la direction d'écoulement. On verra sur la figure 2 les courbes représentatives des variations de Δn (différence d'indice pour les lignes neutres) en fonction

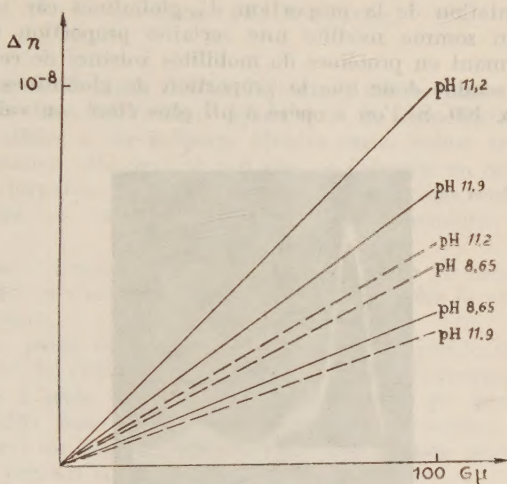


FIG. 2.

du produit $G\mu$ (où G représente le gradient de vitesse de l'écoulement et μ la viscosité du solvant).

Dans le tableau B sont portées les valeurs du rapport $\frac{\Delta n}{G\mu}$ pour les différentes solutions.

TABLEAU B.

PH	8,65	11,2	11,9
Solutions sans cuivre mais avec cyanure.	$4 \cdot 10^{-9}$	$10 \cdot 10^{-9}$	$7,2 \cdot 10^{-9}$
Solutions dont le cuivre a été enlevé par le cyanure.	$5,25 \cdot 10^{-9}$	$5,75 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$

On voit que l'influence du cuivre est minime et que la présence de cyanure est le facteur primordial.

La biréfringence ainsi observée est-elle la preuve d'une modification portant sur toutes les molécules d'albumine ou seulement sur certaines d'entre elles? L'électrophorèse peut nous aider à éclaircir ce point. En effet, si après combinaison avec le cuivre puis enlèvement du métal par le cyanure, on soumet à l'électrophorèse la solution d'albumine

utilisée ci-dessus, on obtient le diagramme ci-contre (cas de pH 8,65) (fig. 3). En comparant ce diagramme avec le précédent, on note :

- 1° Que l'albumine se comporte comme précédemment, mais
- 2° Que la proportion d'impuretés s'est accrue.

Dans le premier diagramme, l'impureté était constituée par 7,7 p. 100 d' α -globulines. Dans le second diagramme, on a l'impression visuelle d'une augmentation de la proportion d' α -globulines car nos manipulations ont en somme modifié une certaine proportion d'albumines en la transformant en protéines de mobilités voisines de celles des globulines α . Il semble donc que la proportion de globulines s'est élevée jusqu'à 13,6 p. 100. Si l'on a opéré à pH plus élevé, on voit la propor-

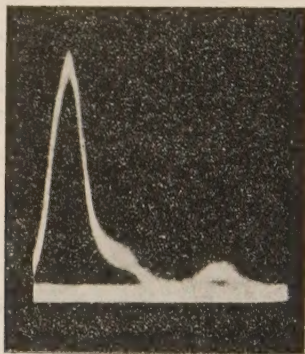


FIG. 3.

tion d'impuretés néoformées s'élever plus encore (25,4 p. 100 à pH 11,2 et 33,2 p. 100 à pH 11,9).

En résumé, le cyanure modifie les protéines et fait apparaître 1° une biréfringence d'écoulement et 2° des fractions de mobilité électrophorétique moindre.

Mais la combinaison des protéines avec le cuivre ne fait pas apparaître de biréfringence d'écoulement et l'enlèvement ultérieur du cuivre par dialyse en présence de cyanure ne modifie pas plus profondément la protéine que ne le fait le cyanure agissant seul sans cuivre. Après cet enlèvement du métal par le cyanure, la majeure partie de l'albumine a conservé ses caractères électrophorétiques initiaux et peut encore cristalliser.

Les mesures de biréfringence furent effectuées dans les laboratoires du Centre d'Etude de Physique Monomoléculaire (de Strasbourg), dirigé par M. Sadron que nous tenons à remercier très vivement.

(Institut Pasteur.)

DOSAGE DE L'ACIDE FORMIQUE EN MÉLANGE AVEC D'AUTRES ACIDES VOLATILS

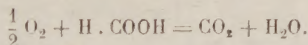
par CLAUDE PÉAUD LENOËL.

La méthode de Duclaux donne de bons résultats pour le dosage des acides volatils dans les milieux ayant subi la fermentation butyrique lorsqu'on a affaire à un mélange binaire mais, même avec la modification de Virtanen, elle devient peu sûre et épineuse en ce qui concerne les mélanges ternaires. Or, les milieux de fermentation renferment, dans la plupart des cas, au moins trois acides : formique, acétique et butyrique.

Le problème consiste donc à éliminer et à doser en même temps un des trois acides et c'est l'acide formique qui se prête le plus facilement à ces opérations.

J'ai mis au point dans ce but la technique suivante inspirée de la méthode de O. L. Osburn, H. Wood et C. W. Weckmann (1).

Théorie. — L'acide formique est un réducteur qui peut être oxydé par des réactifs doux sans toucher aux autres acides. Les auteurs emploient HgO en milieu phosphorique. La réaction se fait à chaud, on entraîne, par un courant d'air, le CO₂ formé.



Ce gaz est reçu sur de la potasse et dosé volumétriquement.

Technique. — On opère dans l'appareil représenté par la figure et constitué par un ballon à réaction de 300 cm³ où passe un courant d'air sans CO₂. Les gaz s'échappent à travers un réfrigérant à reflux et traversent un absorbeur de Heck (2) rempli de potasse 0,1 N environ. Cet appareil constitue un piège à CO₂ absolument remarquable et donne d'excellents résultats. On place dans le ballon à réaction une partie aliquote des acides totaux, extraits à la vapeur et neutralisés par NaOH, de façon à avoir une prise d'essai contenant de 20 à 100 mg. de H. COOH. On laisse barbotter l'air sans CO₂ et on fait bouillir à reflux quinze minutes pour chasser le CO₂ des carbonates après avoir acidulé le liquide par PO₄H₃. On laisse refroidir et, pendant ce temps, on remplit la tour à billes avec 50 cm³ de potasse 0,1 N environ, de façon que le liquide atteigne le sommet des billes quand le courant d'air passe bulle à bulle dans l'absorbeur.

Il faut donc que la colonne coulisse facilement dans le bouchon de caoutchouc qui la maintient.

On ajoute dans le ballon à réaction 3 g. d'oxyde rouge de mercure et on fait bouillir vingt minutes à feu doux.

(1) O. L. OSBURN, WOOD et WECKMANN, *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 1933 5, 247.

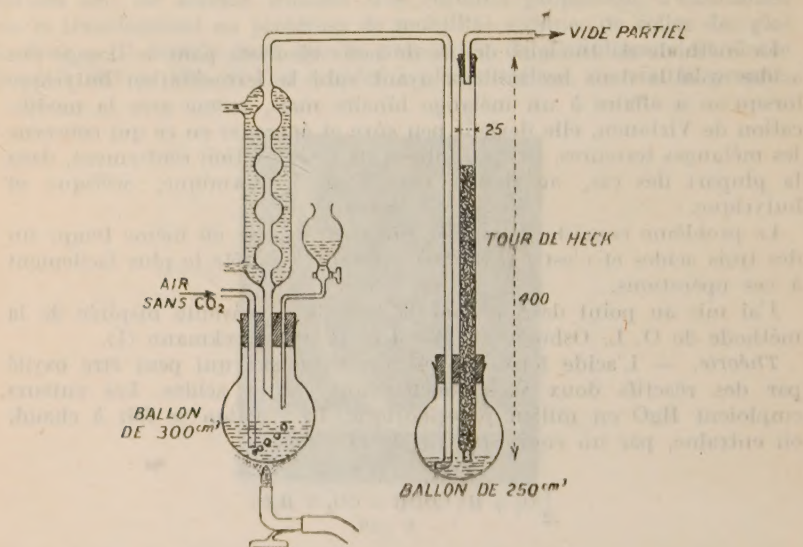
(2) HECK, *Soil Sci.*, 1929, 28, 225

On ajoute ensuite, goutte à goutte, 10 cm³ d'acide ortho-phosphorique à 50 p. 100 et on fait bouillir encore quinze minutes.

On détache ensuite la tour à billes et on lave l'alcali de la tour dans le ballon contenant la potasse avec de l'eau sans CO₂ jusqu'à neutralité du liquide qui s'écoule.

On ajoute dans ce ballon 5 cm³ de BaCl₂ en solution à 10 p. 100.

On titre par HCl 0,1 N.



Un essai à blanc donne le zéro de l'appareil qui ne doit pas dépasser 0,30 cm³ HCl 0,1 N.

1 cm³ HCl 0,1 N correspond à 2,3 mg. H. COOH ; en effet, 1 HCl = 2 CO₂ ou 2 H. COOH.

La précision obtenue par cette méthode est 1 p. 100 avec une prise d'essai de 50 mg. H. COOH.

On peut ensuite, par filtration, récupérer les acides volatils qui se trouvent encore dans le ballon à réaction et titrer le mélange par la méthode de Duclaux.

Nous avons pu suivre ainsi la variation de la formation de l'acide formique dans les milieux fermentés en fonction de différents facteurs qui feront l'objet de communications ultérieures.

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

Le Gérant : G. MASSON.